



**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Molecular**

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES Y APLICACIONES DEL  
VIRUS DE LA PSEUDORRABIA (PRV) CUYA EXPRESIÓN  
INMEDIATAMENTE TEMPRANA ES CONTROLADA POR  
PROMOTORES TUMORALES HUMANOS**

**Laura Lerma Martínez**

Madrid, 2018



**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Molecular**

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES Y APLICACIONES DEL  
VIRUS DE LA PSEUDORRABIA (PRV) CUYA EXPRESIÓN  
INMEDIATAMENTE TEMPRANA ES CONTROLADA POR  
PROMOTORES TUMORALES HUMANOS**

**TESIS DOCTORAL**

**Laura Lerma Martínez**

**Madrid, 2018**



**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Molecular**

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES Y APLICACIONES DEL  
VIRUS DE LA PSEUDORRABIA (PRV) CUYA EXPRESIÓN  
INMEDIATAMENTE TEMPRANA ES CONTROLADA POR  
PROMOTORES TUMORALES HUMANOS**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Bioquímica Laura Lerma Martínez para optar al grado de Doctor en Biociencias Moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid bajo la dirección de los Drs. Enrique Tabarés López y Bruno Sainz Anding.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto del FIS PI0/02788, “Expresión de la proteína quimérica gDB2 de herpes simples tipo 2 por baculovirus y de la proteína IE180 del virus de la pseudorrabia bajo control de promotores tumorales humanos” y por la dotación Ramón y Cajal concedida al Dr. Bruno Sainz.



El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid bajo la dirección de los Drs. Enrique Tabarés López y Bruno Sainz Anding.

Madrid, 2018

Fdo. Enrique Tabarés López

Fdo. Bruno Sainz Anding

## AGRADECIMIENTOS

Puedo decir sin temor a equivocarme que este es el capítulo más difícil de escribir de toda la tesis. Te sientas frente a una hoja en blanco y empiezas a echar la vista atrás y a recordar desde aquella primera vez que llegas al laboratorio: un sitio nuevo, gente nueva y mucho por aprender y descubrir. De repente soy consciente de todo lo vivido durante estos años, infinitas cosas buenas y otras que no lo han sido tanto, pero de las que sacas la parte buena, porque te hacen más fuerte y, sobre todo, porque gracias a ellas he podido ser totalmente consciente de la gente tan maravillosa que tengo a mi lado y lo tremendamente afortunada que soy por ello. Por eso la dificultad de estas líneas, porque son para ellos, porque seguramente no serán suficiente para expresar lo agradecida que me siento y es que sin ellos este trabajo no habría sido posible.

En primer lugar quiero darles las gracias a mis directores de tesis. A Enrique Tabarés, por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí desde el primer día, por su dedicación y paciencia infinitas, por haberme transmitido su pasión por la ciencia y por el laboratorio. A Bruno Sainz, por confiar en mí y animarme a perseguir aquello en lo que creo, por permitirme ser una más en su laboratorio, por estar siempre dispuesto a ayudar y a enseñar y por su generosidad. A ambos gracias por enseñarme a ser mejor persona en el mundo de la ciencia y en la vida y por haberme apoyado en todo momento, saber que siempre he podido contar con vosotros ha hecho que este camino fuera mucho más sencillo.

A todos los compañeros del laboratorio y a los estudiantes que por él han pasado, habéis sido muchos y me llevo grandes momentos con todos vosotros. Gracias a Bea y a Bene, el día a día no habría sido lo mismo sin vosotros. A Raquel, mi pequeña serda, gracias por darme fuerzas durante estos últimos años, porque has sido una gran compañera y me llevo una mejor amiga, Sir Didymus estaría muy orgulloso *my lady*, sobre todo porque con Quique hemos formado un grupo redondo, ¡la de partidas y “china-maría” que nos esperan! A Sonia, Mireia, Laura, Sandra y Marta, habéis sido mi segunda familia en la facultad y un gran apoyo siempre. A María Jesús, Carmen y Rafa, gracias por vuestro apoyo, por vuestras palabras y por todo lo que me habéis enseñado. A Ana, gracias por esa risa tan dulce y porque no podía haber tenido una mejor compañera en esta etapa final. A Sonia, fue poco tiempo juntas en el labo pero suficiente para iniciar una amistad, no pudo ser mejor. A Laura de Citometría, gracias por escucharme y por tantos ratos compartidos. A mi Rosi, por esos abrazos tan

reconfortantes, Jesús y Ros, por las mejores conversaciones “de pasillo” que han amenizado estos años. A Toño y José Luis, por vuestra indispensable ayuda informática y vuestra forma de ser. A David, Marigel, Paula, Mari Cruz, Juanjo, Maica, Rocío, Carla y a todos los compañeros del Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología.

Al Dr. Esteban Domingo por hacerme un hueco en su laboratorio y a toda la gente del CMBSO, Anal, AnaO, Celia, Isabel, Hector, Julie, Ángela y Nacho (¡el mejor compañero de congresos!), gracias por acogerme esos fantásticos meses dentro y fuera del laboratorio. Imposible olvidarme de Eva, lo que unieron unas galletas Dinosaurius no lo separará un holocausto zombi y si además añadimos a la masa a Alfonso, a Ares y a Dafne ya pueden venir todas las abominaciones tóxicas que quieran que no podrán con nosotros. A JAL y su grupo, Antonio, Raquel y Bea, mis compañeros de virus en Cantoblanco.

A toda la gente de Valoralia, gracias por vuestra confianza y por haberme permitido aprender y participar en vuestro proyecto. Diego, que no te libras, gracias por esas hamburguesas y las tardes liberadoras de cotorreo.

A mis amigos, por ser los mejores, por estar siempre ahí a pesar de las largas ausencias, especialmente a mi Pili, gracias por escucharme, comprenderme, por las risas y por los bizcochos en las escaleras con Guille. A Nachete, a pesar de estar tan lejos siempre has estado cerca. Al grupo de Shadowrunners, no hay nada mejor para despejarse que reírse mucho y luchar contra las megacorporaciones, eso o cazar aliens.

A mi familia, mis abuelos y mi tía, por quererme como soy y porque sé que siempre podré contar con vosotros. A mis padres, porque sin ellos no sería quien soy ni habría llegado hasta aquí, gracias por vuestro apoyo continuo e incondicional, por tantos desvelos, por estar siempre a mi lado y por todo lo que me habéis dado, todo lo que pueda deciros se queda corto. A Timo, el mejor compañero, amigo y marido, gracias por ser como eres, por traer serenidad a mi locura, por estar siempre a mi lado y no dejarme caer nunca y por ser capaz de arrancarme siempre una sonrisa hasta en los momentos más difíciles.

A todos y a tantos que me faltan por nombrar: Gracias.



*La única manera de descubrir los límites de lo posible  
es aventurarse un poco más allá, hacia lo imposible.*

Arthur C. Clarke



## Resumen

---

El cáncer es una enfermedad neoplásica que provoca la transformación de las células, incrementando su índice mitótico de manera anormal e incontrolada. Según la Organización Mundial de la Salud, es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y se prevé que los pacientes diagnosticados con cáncer se dupliquen en los próximos 20 años. No obstante, la supervivencia a esta enfermedad se ha multiplicado por tres desde los años 70 gracias a los avances realizados tanto en diagnóstico como en tratamiento, siendo esencial el desarrollo de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas frente al cáncer. Una de las líneas de investigación más novedosas en el campo de la oncología se centra en el estudio de los virus oncolíticos para combatir y tratar el cáncer. Actualmente los estudios se centran principalmente en aumentar la selectividad y la eficacia oncolítica de los virus mediante manipulación genética. El virus herpes más empleado es el herpes simplex tipo 1 (HSV-1), presenta ventajas sobre otras familias víricas en su capacidad de incorporar grandes insertos, existencia de terapias específicas anti-HSV, sin embargo también presenta un gran inconveniente al ser un patógeno humano ya que nunca podrá descartarse su virulencia. Recientemente se ha propuesto al virus de la pseudorrabia (PRV), perteneciente a la misma subfamilia de HSV-1 pero de origen animal, como vector para terapia oncolítica, ya que mantiene las ventajas descritas para HSV-1 y suma otras nuevas.

El presente trabajo se ha centrado en aumentar la selectividad tumoral y la eficacia citolítica de virus PRV recombinantes controlando la transcripción de su único gen inmediatamente temprano, IE180, mediante promotores humanos preferentemente activos en tejidos tumorales: subunidad catalítica telomerasa transcriptasa inversa (hTERT) y antígeno carcinoembrionario (CEA). Para ello, se ha demostrado que ambos promotores pueden sustituir funcionalmente el promotor de la IE180 en plásmidos y en virus PRV recombinantes y se ha observado una capacidad diferencial de la IE180 para regular cada promotor, llevando en el caso del promotor del CEA a la sobre-expresión de la IE180, lo que deriva en inducción de apoptosis en las células infectadas. Se ha observado que los virus recombinantes replican preferentemente en líneas celulares tumorales en comparación con células no tumorales. También se han obtenido virus recombinantes en los que la expresión de la IE180 está regulada bajo control del promotor inducible por tetraciclina, comprobando

que presentan alta replicación en células de cáncer de páncreas en relación a un crecimiento residual en células normales.

## Summary

---

Cancer is a neoplastic disease that causes transformation of cells, increasing their mitotic index in an abnormal and uncontrolled way. According to the World Health Organization, cancer is one of the leading causes of death worldwide and the number of patients diagnosed are expected to double in the next 20 years. In spite of this increase, overall survival has multiplied by three over the past 40 years, thanks to advances made in both diagnosis and treatment, specifically the development of new drugs and therapeutic strategies against cancer. One of the newest research lines in the field of oncology focuses on the study of oncolytic viruses to fight and treat cancer. Currently, the majority of studies have focused mainly on increasing the selectivity and oncolytic efficacy of viruses through genetic manipulation. Of the oncolytic viruses tested to date, herpes simplex type 1 (HSV-1) is the most common, as it has advantages over other viral families, such as its ability to incorporate large inserts and the existence of specific anti-HSV therapies, however, it also has a great disadvantage in that it is a human pathogen since and thus its virulence can never be completely eradicated. Recently, pseudorabies virus (PRV), which belongs to the same subfamily of HSV-1 but of porcine origin, has been proposed as alternate herpes vector in cancer virotherapy, as it shares the described advantages for HSV-1 but at the same time has additional inherent advantages.

This study focused on enhancing the tumor selectivity and cytolytic efficacy of recombinant PRV viruses for tumor cells by controlling the transcription of its single immediate early gene, IE180, using human promoters preferentially active in tumor tissues: human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and carcinoembryonic antigen (CEA). To this end, we demonstrate that both promoters can functionally replace the IE180 promoter in plasmids and in recombinant PRV viruses, and a differential ability of IE180 to regulate each promoter was observed, resulting in the case of the CEA promoter, to the over-expression of IE180 and the subsequent induction of apoptosis in infected cells. We also observed that recombinant viruses replicate preferentially in tumor cell lines compared to non-tumor cells. In addition, recombinant viruses were obtained in which the expression of IE180 is regulated under the control of a tetracycline-inducible promoter, and these viruses showed enhanced specificity and high replication in pancreatic cancer cells compared to normal cells.

## Índice

---

---

<b>1. Clave de abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>5</b>
2.1 HERPESVIRUS: CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN .....	5
2.2 VIRUS DE LA PSEUDORRABIA .....	6
2.2.1 Estructura del virión .....	6
2.2.2 Genoma .....	8
2.2.3 Ciclo infectivo .....	8
2.2.3.1 Entrada .....	9
2.2.3.2 Expresión génica .....	10
2.2.3.2.1 Genes inmediatamente tempranos: IE180 .....	10
2.2.3.2.2 Genes tempranos .....	11
2.2.3.2.3 Genes tardíos .....	12
2.2.3.3 Formación de la cápsida, encapsidación del DNA y salida .....	12
2.2.4 PRV y apoptosis .....	13
2.3 TERAPIA ONCOLÍTICA O VIROTERAPIA DEL CÁNCER .....	14
2.3.1 Cáncer, necesidad de nuevas terapias .....	14
2.3.2 Terapia génica y viroterapia .....	15
2.3.2.1 Selectividad oncolítica .....	17
2.3.2.2 Regulación de la transcripción vírica: promotores tumorales ....	18
2.3.2.2.1 Promotor del gen de la telomerasa .....	18
2.3.2.2.2 Promotor del gen del antígeno carcinoembrionario .....	19
2.3.3 Herpesvirus en viroterapia del cáncer .....	21
2.3.3.1 PRV como agente oncolítico .....	23

<b>3. Objetivos .....</b>	<b>25</b>
<b>4. Materiales y métodos .....</b>	<b>27</b>
4.1 CULTIVOS PROCARIOTAS .....	27
4.1.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	27
4.1.2 Mantenimiento y conservación de cultivos procariotas .....	27
4.1.3 Transformación bacteriana .....	27
4.2 PLÁSMIDOS Y BACs .....	28
4.2.1 Vectores de clonaje .....	28
4.2.2 Plásmidos .....	28
4.2.3 BACs .....	30
4.2.4 Obtención de plásmidos .....	30
4.2.4.1 Plásmido p30GF .....	30
4.2.4.2 Plásmido pACEA-FG .....	31
4.2.4.3 Plásmido pACEA180 .....	32
4.2.4.4 Plásmido pOZPAC-GF-N .....	33
4.2.4.5 Plásmidos pOTER180N y pOCEA180N .....	34
4.2.4.6 Plásmido pOtTA .....	34
4.3 CULTIVOS CELULARES EUCARIOTAS .....	35
4.3.1 Líneas celulares eucariotas .....	35
4.3.2 Mantenimiento y conservación de líneas celulares eucariotas .....	36
4.3.3 Transfección por lipofectamina .....	37
4.3.4 Fijación de células para citometría de flujo .....	38



---

4.4 VIRUS .....	38
4.4.1 Cepas víricas .....	38
4.4.2 Obtención de virus recombinantes .....	39
4.4.2.1 PRV-TER .....	39
4.4.2.2 PRV-CEA .....	40
4.4.2.3 PRV-T180TER .....	40
4.4.2.4 PRV-T180CEA .....	40
4.4.3 Producción y conservación de virus .....	41
4.4.4 Crecimiento de virus .....	41
4.4.5 Producción de amplicones .....	42
4.4.6 Titulación de virus .....	42
4.5 ANÁLISIS DE APOPTOSIS .....	43
4.6 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE DNA .....	43
4.6.1 Aislamiento de DNA plasmídico .....	43
4.6.2 Aislamiento de DNA de BAC .....	43
4.6.3 Aislamiento de DNA vírico .....	44
4.6.4 Amplificación por PCR .....	44
4.6.5 Purificación de productos de PCR .....	46
4.6.6 Secuenciación automática .....	46
4.6.7 Análisis por enzimas de restricción .....	46
4.6.8 Electroforesis en geles de agarosa .....	46
4.7 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE RNA .....	47
4.7.1 Aislamiento de RNA total .....	47

4.7.2 Electroforesis en geles de agarosa .....	47
4.7.3 Reacción de RT-PCR .....	47
4.7.4 Reacción de RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RTqPCR) .....	48
<b>5. Resultados .....</b>	<b>49</b>
5.1 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS PROMOTORES hTERT Y CEA .....	49
5.1.1 Estudio de la actividad de los promotores mediante la expresión de EGFP .....	49
5.1.1.1 Caracterización de los plásmidos pGCEA-A y pACEA-FG .....	49
5.1.1.2 Análisis de la expresión de EGFP bajo promotores tumorales ...	50
5.1.2 Expresión de la proteína IE180 bajo control de promotores tumorales .....	51
5.1.2.1 Caracterización de los plásmidos pACEA180Bs y pACEA180 .....	51
5.1.2.2 Análisis de la transactivación de la expresión de EGFP por promotores tumorales .....	52
5.1.3 Efecto de las proteínas IE180 de PRV e ICP4 de HSV-1 sobre la actividad de los promotores tumorales .....	55
5.1.3.1 Caracterización de los plásmidos pGEL30 y p30GF .....	55
5.1.3.2 Efecto de la IE180 e ICP4 sobre los promotores tumorales .....	55
5.2 CARACTERIZACIÓN DE VIRUS PRV RECOMBINANTES QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA IE180 BAJO CONTROL DE LOS PROMOTORES TUMORALES hTERT Y CEA .....	60
5.2.1 Caracterización de los plásmidos pOTER180N y pOCEA180N .....	60
5.2.2 Análisis del genoma de los virus recombinantes .....	61
5.2.2.1 Análisis de los virus PRV-TER y PRV-CEA .....	61
5.2.2.2 Análisis de los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA .....	62

---

5.2.3 Expresión del gen IE180 por los virus recombinantes PRV-T180TER y PRV-T180CEA .....	64
5.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN IE180 EN LOS VIRUS RECOMBINANTES PRV-TER y PRV-CEA Y DE SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN APOPTOSIS .....	65
5.3.1 Expresión del gen IE180 bajo control de promotores tumorales en los virus recombinantes PRV-TER y PRV-CEA .....	65
5.3.2 Inducción de apoptosis por el virus PRV-CEA .....	66
5.4 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS VIRUS RECOMBINANTES .....	70
5.4.1 Crecimiento vírico en líneas celulares tumorales .....	70
5.4.2 Crecimiento vírico en células primarias de cáncer de páncreas .....	75
5.5 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE VIRUS PRV RECOMBINANTES QUE EXPRESAN LA IE180 BAJO CONTROL DEL PROMOTOR INDUCIBLE POR TETRACICLINA .....	79
5.5.1 Ensayos de producción de virus en células no tumorales .....	80
5.5.2 Propiedades biológicas del virus PRV-BT80GF .....	81
5.5.2.1 Caracterización del plásmido pOtTA .....	81
5.5.2.2 Efecto del transactivador tTA sobre el promotor inducible por tetraciclina en el virus PRV-BT80GF .....	82
5.5.2.3 Ensayos de producción de virus en líneas celulares tumorales .	84
<b>6. Discusión .....</b>	<b>87</b>
6.1 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS PROMOTORES TUMORALES HUMANOS hTERT Y CEA .....	87
6.1.1 Estudio de la actividad de los promotores tumorales .....	87
6.1.2 Efecto de las proteínas IE180 de PRV e ICP4 de HSV-1 sobre la actividad de los promotores tumorales .....	88

6.2 CARACTERIZACIÓN DE VIRUS PRV RECOMBINANTES QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA IE180 BAJO CONTROL DE LOS PROMOTORES TUMORALES hTERT Y CEA .....	90
6.2.1 Análisis de la expresión del gen IE180 en los virus recombinantes PRV-TER y PRV-CEA .....	91
6.2.2 Análisis de la implicación de IE180 en inducción de apoptosis .....	91
6.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS VIRUS RECOMBINANTES .....	93
6.3.1 Propiedades biológicas de virus PRV recombinantes que expresan la IE180 bajo control del promotor inducible por tetraciclina .....	96
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>101</b>
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>103</b>
<b>9. Apéndice .....</b>	<b>121</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de los viriones de la familia <i>Herpesviridae</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del genoma de PRV .....	8
<b>Figura 3.</b> Ciclo infectivo de PRV .....	9
<b>Figura 4.</b> Localización de las secuencias <i>pac</i> en el genoma de PRV .....	12
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de selectividad oncolítica .....	17
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática del promotor mínimo de hTERT .....	19
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de la región central del promotor del CEA .....	21
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de los genomas lineales de los PBACs .....	30
<b>Figura 9.</b> Mapa circular del plásmido p30GF .....	31
<b>Figura 10.</b> Mapa circular del plásmido pACEA-FG .....	32
<b>Figura 11.</b> Mapa circular de los plásmidos pCEA180Bs y pCEA180 .....	33
<b>Figura 12.</b> Mapa circular de los plásmidos pOTER180N y pOCEA180N .....	34
<b>Figura 13.</b> Mapa circular del plásmido pOtTA .....	35
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática de los genomas lineales de los virus recombinantes .....	39
<b>Figura 15.</b> Caracterización del plásmido pACEA-FG .....	50
<b>Figura 16.</b> Análisis funcional de los promotores hTERT y CEA a través de la expresión de la EGFP .....	51
<b>Figura 17.</b> Caracterización de los plásmidos pACEA180Bs y pACEA180 .....	52
<b>Figura 18.</b> Análisis de la actividad de los promotores hTERT y CEA .....	54
<b>Figura 19.</b> Caracterización del plásmido p30GF .....	55
<b>Figura 20.</b> Análisis de la actividad de la proteína ICP4 .....	56

<b>Figura 21.</b> Efecto de las proteínas IE180 e ICP4 sobre el promotor hTERT .....	57
<b>Figura 22.</b> Efecto de las proteínas IE180 e ICP4 sobre el promotor CEA .....	58
<b>Figura 23.</b> Análisis comparativo de la actividad de la proteína IE180 sobre el promotor hTERT y promotores tempranos de PRV .....	59
<b>Figura 24.</b> Caracterización de los plásmidos pOTER180N y pOCEA180N .....	61
<b>Figura 25.</b> Caracterización de los virus PRV-TER y PRV-CEA .....	62
<b>Figura 26.</b> Caracterización de los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA por PCR .....	63
<b>Figura 27.</b> Caracterización de los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA por RT-PCR.	65
<b>Figura 28.</b> Análisis de la expresión de los mRNAs de la proteína IE180 bajo control de los promotores tumorales en los virus PRV-TER y PRV-CEA	66
<b>Figura 29.</b> Comparativa del efecto citopático entre los virus vBecker2 y PRV-CEA	67
<b>Figura 30.</b> Análisis de la inducción de apoptosis por los virus vBecker2, PRV-TER y PRV-CEA .....	68
<b>Figura 31.</b> Análisis de la inducción de apoptosis por la IE180 en células PK15-IE180 .....	69
<b>Figura 32.</b> Imágenes de los ensayos de producción de virus .....	71
<b>Figura 33.</b> Análisis de los ensayos de producción de virus en células tumorales ...	74
<b>Figura 34.</b> Imágenes de los ensayos de producción de virus en líneas primarias de cáncer de páncreas .....	76
<b>Figura 35.</b> Imágenes de los ensayos de producción de virus en líneas primarias de cáncer de páncreas .....	79
<b>Figura 36.</b> Análisis de los ensayos de producción de virus en células no tumorales .....	80
<b>Figura 37.</b> Caracterización del plásmido pOtTA .....	81
<b>Figura 38.</b> Análisis del efecto del transactivador tTA en la actividad del promotor inducible por tetraciclina .....	83

<b>Figura 39.</b> Análisis de los ensayos de producción de virus en células tumorales ...	84
<b>Tabla 1.</b> Parejas de cebadores empleadas en las reacciones de PCR .....	45
<b>Tabla 2.</b> Parejas de cebadores empleadas en las reacciones de qPCR .....	48

## **Clave de abreviaturas**

---



AcNa	Acetato de sodio
AmpR	Resistencia a ampicilina
AP2	Proteína de activación 2
APC	Aloficocianina
BAC	Cromosoma artificial bacteriano
CD20	Antígeno CD20 de linfocitos B
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CMV	Citomegalovirus
CREB	Elemento de respuesta a AMPc
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco
DNApol	DNA polimerasa
DOX	Doxiciclina
E ( $\beta$ )	Gen temprano de herpesvirus
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
eIF2 $\alpha$	Factor eucariota de iniciación de la traducción 2 $\alpha$
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
Epítopo $\alpha$ -gal	Epítopo Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R
Es1p	Subunidad proteica asociada a la telomerasa
Es3p	Subunidad proteica asociada a la telomerasa
F12	Mezcla de nutrientes F12
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G418	Geneticina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCV	Ganciclovir
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HER-2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HIF-1	Factor de transcripción
hpi	Horas post-infección
HSV-1	Herpes simplex tipo 1
hTER	Componente RNA de la telomerasa

hTERT	Subunidad catalítica telomerasa transcriptasa inversa
HVEM (HveA)	Mediador de entrada de los herpesvirus
IE ( $\alpha$ )	Gen inmediatamente temprano de herpesvirus
IFN	Interferón
IgC2	Dominio constante 2 de inmunoglobulina
IgV	Dominio variable de inmunoglobulina
IRS	Secuencia repetida interna
ISRE	Elemento de respuesta estimulado por interferón
L ( $\gamma$ )	Gen tardío de herpesvirus
LB	Medio Luria Bertani
MOI	Multiplicidad de infección
Ori	Origen de replicación
<i>pac</i>	Secuencia de empaquetamiento
PARP	Poli-(ADP ribosa) polimerasa
PRV	Virus de la pseudorrabia
PSA	Antígeno prostático
Ptet	Promotor inducible por tetraciclina
Rec	Zona de recombinación
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Sp1	Factor de transcripción
Sp3	Factor de transcripción
STF	Suero fetal de ternera
STFI	Suero fetal de ternera inactivado
SV40	Virus vacuolante de simio 40
TEP1	Proteína asociada a la telomerasa
tetO	Región del operador del promotor inducible por tetraciclina
TFIID	Factor de transcripción II D
TGA	<i>Therapeutic Goods Administration</i>
TK	Timidina kinasa
TRS	Secuencia repetida terminal
T-VEC	<i>Talimogene laherparepvec</i>

tTA	Transactivador controlado por tetraciclina
U <sub>L</sub>	Región única larga
U <sub>S</sub>	Región única corta
USF	Factor de transcripción
VEGF-A	Factor de crecimiento del endotelio vascular
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactósido

## Introducción

---

## 2.1 HERPESVIRUS: CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN

Los virus herpes se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y producen infecciones en la mayoría de especies animales. Actualmente hay más de 130 herpesvirus identificados. Aunque difieren en las manifestaciones clínicas de la enfermedad que originan, todos ellos comparten una serie de propiedades biológicas (Roizman y col., 2007):

- Codifican para enzimas involucradas en el metabolismo del DNA (timidina kinasa, timidina sintetasa) síntesis de DNA (DNA polimerasa, helicasas) y procesamiento de proteínas (proteín kinasas).
- La síntesis del DNA vírico y el ensamblaje de la cápsida tienen lugar en el núcleo de la célula infectada.
- La producción de la progenie vírica va asociada a la destrucción de la célula infectada.
- Son capaces de establecer latencia en su hospedador natural. El DNA se circulariza y se mantiene como episoma en el núcleo celular y solo se expresa un pequeño grupo de genes.

El orden *Herpesvirales* está compuesto por tres familias: *Herpesviridae*, *Alloherpesviridae* y *Malacoherpesviridae* (Davison, 2010). La familia *Herpesviridae* engloba tres subfamilias: *Alpha-*, *Beta-* y *Gammaherpesvirinae*.

Los miembros de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* poseen un amplio rango de hospedador, un ciclo replicativo relativamente corto, rápida diseminación en cultivos celulares, destrucción de las células infectadas y capacidad de establecer latencia principalmente en neuronas de los ganglios sensoriales (Enquist y col., 1998). Contiene los géneros *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus*.

Los miembros de la subfamilia *Betaherpesvirinae* poseen un rango de hospedador más restrictivo, un ciclo replicativo largo, una lenta progresión de la infección en cultivos celulares, las células infectadas sufren citomegalia y capacidad de establecer latencia en distintos órganos y tejidos como glándulas secretoras, células

linforeticulares o células de riñón (Roizman y col., 2007). Contiene los géneros *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, y *Roseolovirus*.

Los miembros de la subfamilia *Gammaherpesvirinae* poseen un rango de hospedador mucho más restringido, limitado a la familia u orden a los que pertenece el hospedador natural, infectan células linfoblastoides, siendo normalmente específicos de linfocitos T o B, y establecen latencia en el tejido linfoide (Roizman y col., 2007). Contiene los géneros *Lymphocryptovirus* y *Rhadinovirus*.

## 2.2 VIRUS DE LA PSEUDORRABIA

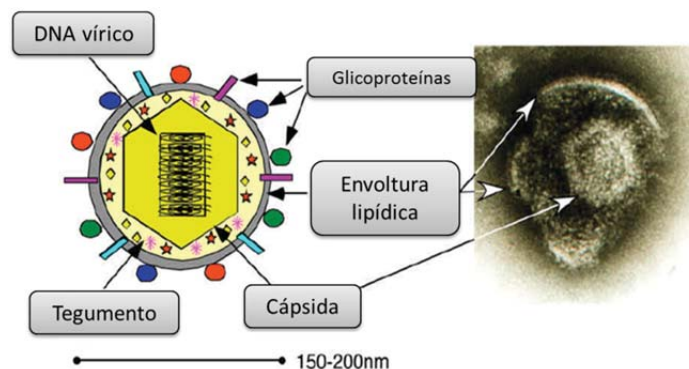
El virus de la pseudorrabia (PRV) pertenece al género *Varicellovirus*, dentro de la subfamilia de los *Alphaherpesvirinae*. Es el causante de la enfermedad de Aujeszky, descrita en 1902 por el veterinario húngaro Aládar Aujeszky, de gran importancia sanitaria y económica en el sector porcino. Tiene un amplio rango de hospedadores, siendo capaz de infectar prácticamente a todos los mamíferos (gatos, perros, ovejas, conejos, vacas), exceptuando a primates superiores y humanos, aunque su hospedador natural es el cerdo, miembros de la familia *Suidae*, y es el único capaz de sobrevivir a una infección productiva, sirviendo como reservorio del virus (Sawitzky, 1997; Müller y col., 2011).

### 2.2.1 Estructura del virión

Como miembro de la familia *Herpesviridae* comparte las características estructurales de los viriones, formados por cuatro componentes morfológicamente distintos (**Figura 1**):

- Core o núcleo nucleoproteico, contiene el genoma consistente en una molécula de DNA linear de doble banda (Mettenleiter, 2000).
- Cápsida icosaédrica, formada por 162 capsómeros (150 hexonas y 12 pentonas) y con aproximadamente 150 nm de diámetro (Mettenleiter, 2002).

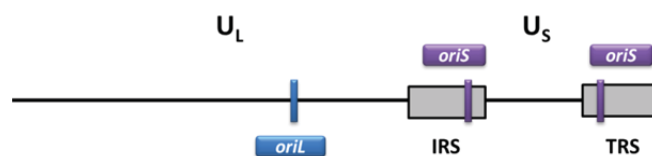
- Tegumento, una capa proteica de aspecto amorfo localizada entre la cápsida y la envoltura de los viriones maduros. Contiene al menos 14 proteínas de origen vírico que tienen un papel importante en la entrada del virus en la célula y en la morfogénesis del virión (Mettenleiter, 2002).
- Envoltura, una bicapa lipídica derivada de membranas intracelulares de vesículas del área trans-Golgi. Contiene 16 proteínas de origen vírico, de las cuales 11 están modificadas por N- u O-glicosilación denominándose glicoproteínas y son designadas como gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM y gN. Las glicoproteínas participan en la unión y entrada del virus en la célula, salida, propagación célula-célula, modulación de la respuesta inmune del hospedador, inducción de inmunidad y formación de sincitios (Nauwynck y col., 2007).



**Figura 1. Estructura de los viriones de la familia *Herpesviridae*.** Los viriones están compuestos por un DNA lineal de doble cadena localizado dentro de la cápsida icosaédrica, el tegumento proteico y la envoltura lipídica con glicoproteínas víricas. (Adaptado de Taylor y col., 2002).

### 2.2.2 Genoma

El genoma de PRV consiste en una doble cadena de DNA lineal, de un tamaño 143.461 pb y un contenido en C+G del 74% (Klupp y col., 2004) y con, al menos, 70 genes. El genoma se encuentra formado por dos regiones únicas unidas covalentemente, una larga ( $U_L$ ) y una corta ( $U_S$ ). La región  $U_S$  se encuentra flanqueada por secuencias repetidas e invertidas, una interna (IR) y otra terminal (TR) (**Figura 2**). La recombinación entre las secuencias repetidas invertidas produce dos isómeros del genoma con la región  $U_S$  en orientación opuesta, siendo ambos isómeros infecciosos (Ben-Porat y Kaplan, 1976). Tiene dos orígenes de replicación, el  $ori_L$ , localizado en la región  $U_L$ , y dos copias del  $ori_S$  localizadas en cada una de las dos regiones repetidas invertidas.



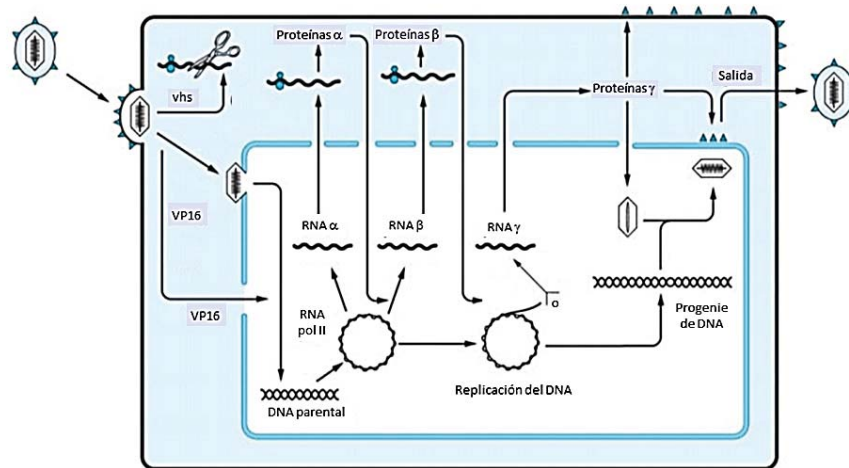
**Figura 2. Representación esquemática del genoma de PRV.** Genoma organizado en dos regiones únicas, una larga ( $U_L$ ) y una corta ( $U_S$ ). La región  $U_S$  se encuentra flanqueada por las secuencias repetidas e invertidas interna (IRS) y terminal (TRS). (Adaptado de Mettenleiter, 2000).

Aproximadamente la mitad de los genes de los alphaherpesvirus se consideran como “no esenciales”, es decir, son dispensables para la replicación vírica en cultivos celulares (Mettenleiter, 2000).

### 2.2.3 Ciclo infectivo

La infección lítica producida por los miembros de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* se puede resumir en tres etapas: 1) introducción del virus en la célula (adsorción y descapsidación), 2) síntesis de los componentes víricos (transcripción, traducción y replicación del genoma) y 3) morfogénesis y liberación (**Figura 3**). La etapa de transcripción/replicación se caracteriza por ser un ciclo corto





Tras la fusión de membranas, la cápsida y el tegumento penetran en el citoplasma celular donde rápidamente van a disociarse. La cápsida interactúa con dineína, una proteína motora asociada a los microtúbulos, para su transporte hasta los poros nucleares, donde el DNA es liberado al interior del núcleo. Una vez en el núcleo celular, el DNA circulariza (Mettenleiter, 2000; Granzow y col., 2005).

### **2.2.3.2 Expresión génica**

La cascada de transcripción comienza en el núcleo celular y la responsable es la RNA polimerasa II del hospedador. La expresión de las proteínas víricas está altamente regulada de manera secuencial, pudiéndose dividir los genes en tres fases denominadas como inmediatamente temprana (IE o  $\alpha$ ), temprana (E o  $\beta$ ) y tardía (L o  $\gamma$ ). Los primeros en ser expresados tras la infección son los genes inmediatamente tempranos ( $\alpha$ ), tienen funciones reguladoras e intervienen en la expresión de los genes tempranos y tardíos. La expresión de los genes tempranos ( $\beta$ ) requiere de la presencia de proteínas  $\alpha$  y producen proteínas implicadas en la replicación del DNA vírico. La replicación del DNA es esencial para la activación de los genes tardíos ( $\gamma$ ), que codifican principalmente para proteínas estructurales del virión (Roizman y col., 2007).

#### **2.2.3.2.1 Genes inmediatamente tempranos: IE180**

Los genes inmediatamente tempranos son expresados en las primeras 2-4 horas tras la infección y en ausencia de la síntesis *de novo* de proteínas celulares, ya que sus promotores son reconocidos por factores transcripcionales propios (transportados por el virión en el tegumento) y del hospedador. Los productos de los genes  $\alpha$  funcionan principalmente como transactivadores de la expresión de genes tempranos ( $\beta$ ) y tardíos ( $\gamma$ ), además de moduladores de la defensa antivírica del hospedador o de los mecanismos fisiológicos celulares requeridos para la infección.

En contraste con la mayoría de los herpesvirus, PRV codifica solo para una proteína inmediatamente temprana, la IE180. El gen de la IE180 está presente en dos copias en el genoma, localizadas en las regiones repetidas invertidas IR y TR y es

esencial para la replicación vírica. Este gen presenta secuencias homólogas con el gen de HSV-1 que codifica para la proteína inmediatamente temprana ICP4 (Cheung, 1989). Ambas proteínas, IE180 e ICP4, presentan un elevado grado de similitud y desarrollan funciones similares a lo largo del ciclo vírico.

La proteína IE180 tiene 1.460 aminoácidos, una masa molecular de 153 KDa, está fosforilada y se acumula en el núcleo de las células infectadas (Cheung, 1989). Al igual que ICP4, IE180 es una proteína multifuncional. Tiene una función de autorregulación negativa sobre su propio promotor, reprimiendo la transcripción de su propio mRNA (Ihara y col., 1983; Vleck y col., 1990). Su papel como un potente transactivador está bien estudiado, puede ayudar a la formación de un complejo estable de preiniciación de la transcripción interaccionando con el factor de transcripción II D (TFIID) (Abmayr y col., 1988), pudiendo además activar la transcripción de promotores celulares humanos, como la beta-globina (Green y col., 1983) y la topoisomerasa I (Wong y col., 1997), y de promotores víricos, como genes tempranos de SV40 o de adenovirus tipo 2 (Pomeranz y col., 2005). Recientemente, se ha descrito que puede inhibir la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 $\alpha$ , asegurando así la traducción de los mRNAs víricos (Van Opdenbosch y col., 2012).

Debido a sus características estructurales y funcionales, se ha demostrado recientemente que la expresión de la IE180 por animales transgénicos, sin que haya infección ni replicación vírica, deriva en el desarrollo de síntomas neurológicos y patologías severas en el cerebelo, llegando a considerarse su implicación en la activación de la apoptosis celular (Taharaguchi y col., 2003; Tomioka y col., 2008).

#### **2.2.3.2.2 Genes tempranos**

Los genes tempranos se expresan entre las 5 y 7 horas tras la infección, antes de la replicación del DNA. Los genes  $\beta$  codifican para proteínas implicadas en la replicación del DNA (DNA polimerasa) y en el metabolismo de nucleótidos (timidina kinasa).

La timidina kinasa (TK), codificada por el gen UL23, es una enzima no esencial para el crecimiento en cultivos celulares, pero importante para la replicación *in vivo* en células diferenciadas como las neuronas (Nauwynck y col., 2007). Fosforila nucleósidos de deoxipirimidina y análogos de nucleósidos. La TK de PRV, tiene una especificidad de sustrato menor que la de HSV-1 (Maga y col., 1993).

### 2.2.3.2.3 Genes tardíos

Los genes tardíos se expresan tras la replicación del DNA, realizada mediante el modelo del círculo rodante, alcanzando un pico máximo entre las 12-17 horas tras la infección. Están divididos en genes tardíos ( $\gamma_1$ ) y genes verdaderamente tardíos ( $\gamma_2$ ), expresados tardíamente en la infección. Los genes  $\gamma$  codifican para proteínas estructurales del virión (Mettenleiter, 2000).

### 2.2.3.3 Formación de la cápsida, encapsidación del DNA y salida

La replicación del DNA produce largas moléculas de DNA concatémicas. Los genomas de los herpesvirus tienen un dominio altamente conservado, denominado *pac1* y *pac2*, al final de sus genomas lineales que actúa como sitio específico para el corte y la encapsidación del DNA. En PRV, el dominio *pac2* se localiza al principio de la región  $U_L$ , mientras que el dominio *pac1* se encuentra en ambas regiones repetidas invertidas, IR y TR (Figura 4) (Harper y col., 1986; Rall y col., 1992). Los concatémicos de DNA del genoma vírico se escinden en monómeros al ser encapsidados dentro de las cápsidas preformadas en el núcleo celular (Homa y Brown, 1997).



**Figura 4. Localización de las secuencias *pac* en el genoma de PRV.** Las secuencias *pac1* se encuentran en ambas regiones IRS y TRS y *pac2* al principio de la región  $U_L$ . (Adaptado de Rall y col., 1992).

Tras la encapsidación del DNA, las cápsidas de PRV salen del núcleo celular a través de la membrana nuclear interna, momento en el que toman una primera envoltura (Granzow y col., 1997). Los viriones dejan el espacio perinuclear al fusionarse la envoltura primaria con la membrana nuclear externa, liberándose las cápsidas desnudas al citoplasma. Un segundo proceso de envoltura tiene lugar en la red del trans-golgi, donde, además, también se incorpora el tegumento. Esta segunda y definitiva envoltura contiene las glicoproteínas víricas. El virión maduro viaja en una vesícula que se va a fusionar con la membrana plasmática, liberándose así la partícula vírica al espacio extracelular (Mettenleiter, 2000).

#### **2.2.4 PRV y apoptosis**

Las infecciones víricas tienden a generar señales proapoptóticas que inducen a la muerte celular y a la fagocitosis para limitar la replicación vírica y su dispersión. Los virus herpes, al igual que otros virus DNA, codifican para proteínas que interfieren con esta respuesta apoptótica, promoviendo la supervivencia celular para beneficiar la replicación vírica y la producción de nuevos viriones (Aubert y col., 2001). PRV es un virus citocida que induce cambios rápidos y extensos en su hospedador y en cultivos celulares. Los efectos citopáticos dependen de la cepa y del tipo celular e incluyen inhibición de mitosis, formación de inclusiones intranucleares, redondeamiento celular y, ocasionalmente, formación de sincitios (Roizman y col., 2007). No obstante, se ha descrito que la inhibición de la apoptosis, realizada por PRV en el ganglio trigémino en su hospedador natural, es temporal y selectiva. Es decir, en tiempos tempranos de la infección no se detectan señales de apoptosis en las células neuronales infectadas, pero sí en células del sistema inmune infiltradas en las zonas del ganglio con focos de infección; mientras que a las 48 horas tras la infección, las células neuronales muestran características típicas de apoptosis (Alemañ y col., 2001; Marcaccini y col., 2006).

## **2.3 TERAPIA ONCOLÍTICA O VIROTERAPIA DEL CÁNCER**

### **2.3.1 Cáncer, necesidad de nuevas terapias**

La palabra “cáncer” es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades genéticas complejas que resultan de la acumulación de múltiples mutaciones que provocan la transformación de las células, incrementando su índice mitótico de manera anormal e incontrolada y que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Los tipos de cáncer más comunes y que más muertes causan al año son el cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de hígado y cáncer de próstata. Según la Organización Mundial de la Salud, es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, en 2012 causó 8,2 millones de defunciones, y en países desarrollados es la segunda causa por detrás de las enfermedades cardiovasculares. Además, se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en los próximos 20 años.

A pesar de los grandes avances en la tecnología diagnóstica y en los tratamientos, el principal problema de la terapia anti-cáncer es la incompleta erradicación de los tumores invasivos, por lo que células tumorales residuales sobreviven incluso a combinaciones de cirugía, radioterapia y quimioterapia, derivando en un cáncer recurrente. La biología molecular moderna ha ayudado a comprender mejor los genes y las proteínas, su regulación y sus funciones en rutas celulares y, especialmente, su disfunción y su papel en enfermedades. Aunque este conocimiento ha ayudado a desarrollar nuevas terapias con una mayor especificidad, aumentando así la artillería de quimioterapias en uso en la clínica, las terapias utilizadas en la actualidad solo mejoran ligeramente el tiempo de supervivencia (mayoritariamente en pequeños grupos de pacientes) y raramente resulta en un aumento de la supervivencia sin progresión de la enfermedad a largo plazo (Dorer y Nettelbeck, 2009; Von Hoff y col., 2013). Por estas razones, sigue existiendo una gran necesidad de desarrollar nuevos fármacos y novedosas estrategias terapéuticas frente al cáncer.

### 2.3.2 Terapia génica y viroterapia

La terapia génica se ha definido como una nueva estrategia para el tratamiento de defectos genéticos al reemplazar el gen defectivo por uno funcional que corrija las mutaciones causantes de desórdenes hereditarios severos (Verma y Weitzman, 2005; Zhang y col., 2011; Dunbar y col., 2018). Este concepto probablemente no sea el idóneo para el tratamiento del cáncer ya que la transferencia génica en cada célula tumoral del paciente es extremadamente complicada. Por ello, una nueva aproximación es la de transferir genes que codifiquen para proteínas terapéuticas y que sean capaces de afectar a aquellas células que no hayan obtenido el transgen, ya sea mediante inducción de apoptosis (Ru y col., 2017), activación de la respuesta inmune anti-cáncer (List y Neri, 2013) o con genes que codifican para enzimas que activan profármacos (Karjoo y col., 2017). La transferencia de los genes se realiza mediante vectores que pueden ser víricos y no víricos (Osten y col., 2007; Bhatia y col., 2013; Mavroudi y col., 2014).

Dentro del campo de la terapia génica y desde las últimas décadas, se ha investigado en virus recombinantes para desarrollar una nueva estrategia contra el cáncer, denominada viroterapia u oncolisis vírica. La viroterapia se define como la muerte de las células tumorales por una infección, replicación y lisis vírica selectiva que no afecta a células normales, siendo el propio virus el agente terapéutico (Sze y col., 2013; Maroun y col., 2017;).

El uso de la viroterapia presenta una serie de ventajas frente a los tratamientos convencionales (quimioterapia, radioterapia y cirugía):

- Los efectos secundarios producidos en los ensayos clínicos hasta la fecha han consistido únicamente en estados febriles y cuadros gripales, apareciendo efectos tóxicos de mayor seriedad solo en casos aislados (Miest y Cattaneo, 2014).
- La administración de los virus oncolíticos puede darse de distintas maneras: de forma sistémica, por inyección directa en el tumor, intravascular, mediante catéter implantado quirúrgicamente o combinando las diferentes técnicas (Bell y McFadden, 2014).

Además de presentar numerosas ventajas contra los tumores, la viroterapia oncolítica también tiene muchos inconvenientes, entre los que podemos destacar (Poll y col., 2014):

- Los virus oncolíticos infectan lesiones neoplásicas de forma heterogénea e incompleta.
- Los virus oncolíticos pueden establecer un “equilibrio dinámico” con los tumores, infectando un conjunto de células muy restringidas en lugar de a toda la población, lo que permite que el tumor siga proliferando.
- Las células tumorales, debido a su inestabilidad genética, pueden desarrollar resistencia frente a la viroterapia oncolítica.
- En general, la población humana expresa anticuerpos neutralizantes contra un diverso rango de virus por su exposición a los mismos a lo largo de su vida. Muchos de estos virus se emplean como oncolíticos, por lo que habrá que modificarlos para que no sean neutralizados por el sistema inmune y puedan actuar sobre las células cancerígenas.
- El virus oncolítico es una partícula extraña a nuestro organismo que reaccionará frente a ellos, provocando su secuestro en el hígado o el bazo disminuyendo la cantidad de partículas que alcanzarán el tumor. Este secuestro puede desencadenar la activación de la respuesta inmune originando un estado inflamatorio a consecuencia de la liberación de citoquinas.

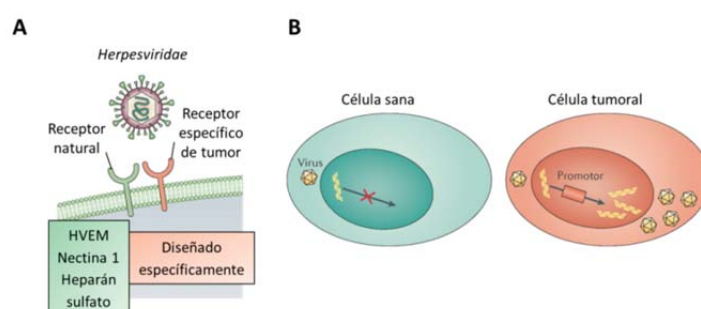
Sin embargo, se han conseguido superar muchos de estos inconvenientes gracias a distintas estrategias de modificación de los virus. Estas estrategias van destinadas a mejorar la selectividad oncolítica de los virus, además de a potenciar la respuesta inmune antitumoral (Chiocca y Rabkin, 2014) o suprimir la angiogénesis en los tumores (Hutzen y col., 2014).



### 2.3.2.1 Selectividad oncolítica

Actualmente, los estudios se centran principalmente en aumentar la selectividad y la eficacia oncolítica de los virus manipulados genéticamente. La selectividad tumoral es la clave para la implementación de estas terapias en la oncología clínica, sin embargo, los virus a menudo carecen de una selectividad inherente por las células tumorales, por lo que existen dos niveles principales para modificar la selectividad vírica:

- Durante la unión y entrada del virus en la célula. Las células tumorales sobre-expresan receptores y proteínas en su superficie, como CD20, el antígeno prostático específico de membrana (PSA) o HER-2 (Russell y col., 2012). Las modificaciones tienen que eliminar el tropismo natural del virus y redireccionar su unión hacia nuevas moléculas de la superficie de las células tumorales, para lo que es necesario un gran conocimiento de las interacciones moleculares con los receptores celulares (**Figura 5A**) (Verheije y Rottier, 2012).
- Tras la entrada del virus en la célula. La estrategia más establecida se basa en regular y controlar la transcripción de genes víricos esenciales, empleando promotores que son específicos o que se encuentran preferentemente activos en tejidos tumorales (**Figura 5B**) (Dorer y Nettelbeck, 2009).



**Figura 5. Mecanismos de selectividad oncolítica.** **A.** Selectividad durante la unión del virus a la célula, eliminando el tropismo natural del virus y redireccionándolo hacia marcadores de superficie tumorales. **B.** Selectividad tras la entrada a la célula basada en promotores que se expresan muy activamente en células tumorales, activando la expresión de los genes víricos únicamente en tumores. (Adaptado de Miest y Cattaneo, 2014).

### **2.3.2.2 Regulación de la transcripción vírica: promotores tumorales**

Para el control de la replicación vírica se necesitan promotores que tengan una baja o nula actividad en células normales, por lo que es esencial analizar la actividad del promotor y su especificidad ya que se ha demostrado que pueden perder su especificidad en el contexto de una infección al intervenir elementos víricos como proteínas con actividad transcripcional (Hurtado y col., 2004). Hasta la fecha, se han empleado un gran número de promotores tumorales distintos en ensayos de viroterapia, como el antígeno prostático específico (cáncer de próstata), la telomerasa (varios tipos de cáncer), la mesotelina (mesotelioma, varios tipos de cáncer), la nestina (tumor cerebral) o el antígeno carcinoembrionario (tipos de cáncer que expresan CEA) (Dorer y Nettelbeck, 2009).

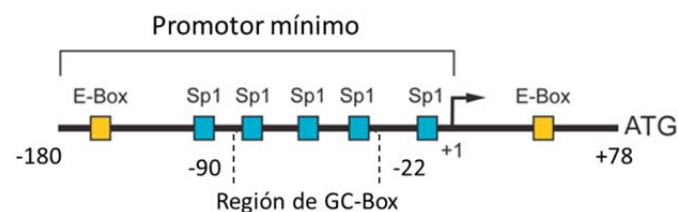
#### **2.3.2.2.1 Promotor del gen de la telomerasa**

La telomerasa es una ribonucleoproteína celular con actividad retrotranscriptasa y es responsable de la adición de secuencias repetidas TTAGGG en el extremo 3' de los cromosomas (Collins y Mitchell, 2002). Los telómeros protegen a los cromosomas de la degradación y son esenciales para la integridad genómica y la viabilidad celular. En las células normales, el proceso de replicación del DNA es incapaz de completar la síntesis de los extremos cromosómicos, perdiéndose entre 50 - 200 pares de bases en cada ciclo de división. Esta reducción o la completa pérdida de los telómeros terminan llevando a las células a la senescencia. Sin embargo, la gran mayoría de los tumores presentan actividad telomerasa, necesaria para la inmortalización y su continuo crecimiento (Leão y col., 2018).

Se han identificado varios componentes de la telomerasa: un componente de RNA (hTER), que actúa como molde para la síntesis de las secuencias teloméricas; la subunidad catalítica telomerasa transcriptasa inversa (hTERT); una proteína asociada (TEP1); y subunidades proteicas adicionales (Es1p y Es3p) (Nugent y Lundblad, 1998). No obstante, se ha demostrado que solamente hTER y hTERT son necesarios para establecer la actividad telomerasa; hTER se expresa en la mayoría de los tipos

celulares, siendo hTERT el componente limitante necesario para reestablecer la actividad (Weinrich y col., 1997).

La caracterización de las secuencias del promotor de hTERT reveló una región central, o promotor mínimo (**Figura 6**), localizada entre los nucleótidos +1 y -180 desde el lugar de inicio de la transcripción y que contiene una secuencia E-box (CACGTG), reconocida por factores de transcripción codificados por la familia de proto-oncogenes Myc; varias secuencias GC-box (GGGGGG), reconocidas por factores de transcripción Sp1; y sitios de unión para hormonas (estrógeno y progesterona) y otros factores de transcripción celulares (HIF-1) (Cong y col., 1999; Horikawa y col., 1999; Takakura y col., 1999). Así mismo, se han descrito mecanismos epigenéticos de regulación (Daniel y col., 2012).



**Figura 6. Representación esquemática del promotor mínimo de hTERT.** Localizado entre los nucleótidos +1 y -180 desde el lugar de inicio de la transcripción, contiene una secuencia E-box y varias secuencias GC-box. La flecha indica el lugar de inicio de la transcripción. (Adaptado de Palumbo y col., 2009).

Todos estos datos sugieren al promotor de hTERT como un buen candidato para el control transcripcional de genes víricos en el desarrollo de virus oncolíticos, con la ventaja de que pueden ser aplicados de manera universal en el tratamiento de muchos tipos de tumores.

#### 2.3.2.2.2 Promotor del gen del antígeno carcinoembrionario

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína con funciones en la adhesión celular, un contenido aproximado del 50% en carbohidratos, debido a glicosilación en residuos de asparagina, y un peso molecular de 200 KDa (Coligan y col., 1972). La familia génica del CEA, perteneciente a la superfamilia de las

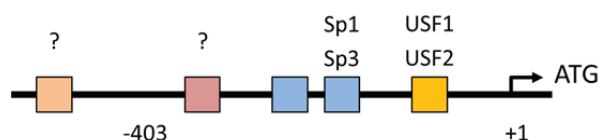
inmunoglobulinas, está dividida en tres subgrupos con 29 genes y pseudogenes distintos en total, 12 de ellos pertenecen al subgrupo del CEA. Poseen dos tipos de dominios inmunoglobulina: un dominio N-terminal homólogo al dominio variable IgV y hasta seis dominios homólogos al dominio constante IgC2. Un péptido señal precede al dominio N-terminal y es eliminado tras el transporte de la proteína a la superficie celular, donde queda anclada mediante una molécula de glicosil fosfatidil inositol (Williams y Barclay, 1988).

La expresión del CEA comienza durante el periodo fetal, entre las semanas 9 y 14 del desarrollo. En tejidos adultos se mantiene su expresión en células epiteliales y mucosas de colon, estómago, lengua, esófago, cérvix, glándulas sudoríparas y próstata (Nap y col., 1988). En las células epiteliales normales presenta una estricta localización apical.

Los miembros de la familia del CEA se expresan en varios tumores de origen epitelial. Se considera que el CEA se encuentra sobre-expresado en carcinoma gástrico, carcinoma colorectal, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma endometrial y carcinoma mucinoso de ovario (Nap y col., 1988; Rizeq y col., 2017). Al contrario que en células normales, se puede encontrar el CEA en toda la superficie de las células tumorales, incluyendo el lumen intraglandular e intracelular.

El CEA se emplea como marcador tumoral a pesar de ser una molécula que se expresa tanto en tejidos sanos como tumorales. Esto es debido a que en individuos sanos la mayor parte se produce en el colon y se elimina con las heces, mientras que en pacientes con adenocarcinoma de colon el CEA se acumula en la sangre, aumentando su concentración a medida que aumenta el tamaño del tumor (Hammarström, 1999; Duffy, 2001).

La región central del promotor, localizada entre los nucleótidos -403 y -124 desde el inicio de traducción, carece de los elementos clásicos TATA-box y CAAT-box (**Figura 7**). Se han descrito cuatro sitios de unión de factores de transcripción como Sp1, Sp3 y USF, ricos en GA en vez de en GC. Se ha descrito una región silenciadora entre los nucleótidos -424 y -832 (Schrewe y col., 1990; Hauck y Stanners, 1995).



**Figura 7. Representación esquemática de la región central del promotor del CEA.** Localizado entre los nucleótidos -402 y -124 desde el codón de inicio de la traducción, contiene secuencias de unión para factores de transcripción. (Adaptado de Hauck y Stanners, 1995).

Gracias a los estudios de caracterización realizados, se están llevando a cabo trabajos en los que se emplea el promotor del CEA para el desarrollo de virus oncolíticos específicos para el tratamiento del adenocarcinoma de colon.

### 2.3.3 Herpesvirus en viroterapia del cáncer

Gracias a los avances tecnológicos, ha sido posible modificar genéticamente a los virus para incrementar la seguridad y su selectividad por células tumorales. La primera aproximación se realizó en 1991 con un virus herpes simplex tipo 1, defectivo en el gen de la TK, y en un modelo experimental de glioma (Martuza y col., 1991). Más adelante, en el año 2000, se publicó el primer virus oncolítico en someterse a pruebas clínicas, el adenovirus Onyx-015 (Ganly y col., 2000). Desde entonces, muchos tipos de virus oncolíticos se encuentran en fases clínicas I, II y III. Estos virus pertenecen a nueve familias distintas: *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, *Herpesviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Reoviridae*, *Poxviridae*, *Retroviridae* y *Rhabdoviridae* (Miest y Cattaneo, 2014).

El herpesvirus más utilizado en viroterapia del cáncer es el virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Los tipos de vectores que se emplean para el tratamiento del cáncer son amplicones y virus recombinantes con replicación condicionada (Watanabe, 2010). HSV-1 presenta una serie de ventajas sobre el resto de los virus (Aghi y Martuza, 2005; Shen y Nemunaitis, 2006; Campadelli-Fiume y col., 2011):

- HSV-1 es un patógeno humano común, presente en aproximadamente el 90% de la población y en la mayoría causa una enfermedad autolimitada, caracterizada por lesiones locales y la persistencia del virus latente en el

ganglio trigémino. Solo en un pequeño porcentaje de individuos puede causar encefalitis.

- Hay terapias específicas anti-HSV que pueden emplearse como medida de seguridad.
- Tiene un genoma de gran tamaño con muchos genes no esenciales para la replicación vírica, proporcionando espacio para insertar genes terapéuticos.
- El DNA nunca se integra en el genoma del hospedador, sino que permanece como un episoma en el núcleo celular, lo que elimina los riesgos de mutagénesis insercional.
- Las glicoproteínas de la envoltura lipídica toleran inserciones y modificaciones permitiendo modificar su tropismo.
- En ensayos clínicos podemos encontrar distintos HSV-1 que han logrado mejoras significativas en algunos pacientes sin haber mostrado efectos nocivos.

Sin embargo, también presenta una serie de inconvenientes que hay que tener en cuenta a la hora de trabajar con vectores HSV-1 (Aghi y Martuza, 2005; Shen y Nemunaitis, 2006; Campadelli-Fiume y col., 2011):

- Las uniones no específicas con el heparán sulfato podrían desviar al virus de las células tumorales diana.
- Podría ocurrir recombinación entre el virus oncolítico y el virus endógeno del paciente, haciendo que el primero recupere la virulencia. No obstante, ésta es una posibilidad remota, ya que ambos tendrían que infectar activamente la misma célula.

La reciente aprobación en el año 2015 del virus HSV-1 Talimogen laherparepvec (T-VEC, Imlygic<sup>TM</sup>) por la FDA en Estados Unidos, la EMA en la Unión Europea y la TGA en Australia (Pol y col., 2016; Rehman y col., 2016), ha marcado un hito en el desarrollo de virus oncolíticos y ha incrementado el interés por la investigación en virus herpes en terapia génica. El T-VEC, que expresa el factor estimulante de colonias de granulocitos

y macrófagos (GM-CSF), ha sido uno de los primeros productos de terapia génica aprobados para su uso en inmunoterapia del cáncer, concretamente en el tratamiento de pacientes con melanoma (Harrington y col., 2015; Johnson y col., 2016). Presenta modificaciones genéticas que promueven la replicación selectiva en células tumorales y que reducen la patogenicidad vírica mientras se estimula una respuesta inmune a través del GM-CSF al reclutarse células dendríticas y macrófagos en el tumor y promover su maduración (Rehman y col., 2016).

### **2.3.3.1 PRV como agente oncolítico**

PRV y HSV-1 pertenecen a la subfamilia de los *Alphaherpesvirinae*, por lo que comparten las mismas características estructurales y biológicas. Entre ellas se encuentra el amplio rango de hospedador, lo que permite que PRV pueda infectar células de distintos organismos incluyendo una amplia variedad de células humanas. Sin embargo, se sabe que, a pesar de esta capacidad, no causa ninguna enfermedad en los seres humanos (Sawitzky, 1997), lo que le convierte en un vector seguro para su empleo en terapia génica (Boldogkői y col., 2002; Prieto y col., 2002; Oehmig y col., 2004).

Gracias a esto, PRV se propuso como vector para la terapia oncolítica (Boldogkői y col., 2002; Boldogkői y Nógrádi, 2003; Wollmann y col., 2005; Shiau y col., 2007). PRV, además de mantener todas las ventajas de HSV-1 descritas en el apartado anterior, suma otras nuevas: tiene un único gen inmediatamente temprano, que codifica para la proteína IE180, lo que facilita el control de la replicación vírica, ya que controlando la transcripción de este gen se puede controlar todo el ciclo replicativo del virus. Igualmente, salva parte de las desventajas ya que, al no ser un patógeno humano, no podrá recombinar con virus endógenos y los pacientes no tendrán anticuerpos que puedan neutralizarlo.

En el trabajo presentado en esta tesis se ha seleccionado el virus de la pseudorrabia (PRV) para el desarrollo de virus oncolíticos por las ventajas que muestra frente al virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), para el que existen multitud de estudios en este campo. La selectividad antitumoral se ha generado a través de una estrategia basada en regular la transcripción vírica mediante el control de la expresión de la única proteína inmediatamente temprana de PRV, la IE180, con promotores tumorales humanos. Existen muchos promotores específicos tumorales que han sido empleados para controlar la replicación de virus oncolíticos entre los que hemos elegido el promotor de la subunidad catalítica telomerasa transcriptasa inversa (hTERT), que al encontrarse activo en más del 90% de los tumores humanos es un buen candidato para controlar un virus oncolítico con el que tratar muchos tipos de tumores, y el promotor del antígeno carcinoembrionario (CEA), un buen candidato para controlar un virus oncolítico con el que tratar tumores de origen epitelial que sobre-expresan CEA. Se ha demostrado que ambos promotores pueden sustituir funcionalmente el promotor de la IE180 en plásmidos y en virus PRV recombinantes y se ha observado una capacidad diferencial de la IE180 para regular cada promotor, llevando en el caso del promotor del CEA a la sobre-expresión de la IE180, lo que deriva en inducción de apoptosis en las células infectadas. Se ha observado que los virus recombinantes replican preferentemente en líneas celulares tumorales en comparación con células no tumorales. También se han obtenido virus recombinantes en los que la expresión de la IE180 está regulada bajo control del promotor inducible por tetraciclina, comprobando que presentan alta replicación en células de cáncer de páncreas en relación a un crecimiento residual en células normales.



## Objetivos

---

Los objetivos de esta Tesis Doctoral están basados en el desarrollo y la utilización del virus de la pseudorrabia (PRV) como vector en terapia oncolítica o viroterapia. Para ello, se han llevado a cabo los siguientes objetivos:

1. Análisis de la expresión de la proteína IE180 de PRV bajo los promotores tumorales hTERT y CEA.
2. Efecto de la proteína IE180 sobre la actividad de los promotores tumorales hTERT y CEA.
3. Obtención de virus PRV recombinantes que expresen la proteína IE180 bajo el control de los promotores tumorales hTERT y CEA.
4. Ensayo de la actividad citolítica de los virus PRV recombinantes en cultivos de células tumorales, tanto en líneas establecidas como en líneas primarias.

Durante el desarrollo de este trabajo, los resultados obtenidos han llevado al planteamiento de dos nuevos objetivos a desarrollar:

5. Estudio de la inducción de apoptosis por la proteína IE180.
6. Obtención de virus PRV recombinantes que expresen la proteína IE180 bajo el control del promotor inducible por tetraciclina y ensayo de su actividad citolítica en cultivos de células tumorales.

## **Materiales y métodos**

---

## 4.1 CULTIVOS PROCARIOTAS

### 4.1.1 Cepas de *Escherichia coli*

**DH5 $\alpha$**  (Hanahan, 1983). Empleada para la propagación de los plásmidos. Posee una mayor eficiencia de transformación, es deficiente en recombinación y produce  $\alpha$ -complementación.

**DH10B** (Lin y col., 1992). Empleada para la propagación de los BACs. Facilita la estabilidad de plásmidos grandes y el clonaje de DNA metilado. Es deficiente en recombinación.

### 4.1.2 Mantenimiento y conservación de cultivos procariotas

Las células de *E. coli* se cultivaron para su crecimiento a 37°C durante 16 horas en medio Luria Bertani (LB) estéril (Bactotripton 10 g/l (BD), Bacto extracto de levadura 5 g/l (BD), NaCl 5 g/l y D-glucosa 1 g/l, en agua desionizada y con pH ajustado a 7 con NaOH 2N). Para las placas de LB sólido se añade agar (BD) al 1,5%.

Las bacterias transformadas con plásmidos fueron seleccionadas por su crecimiento tras una incubación de 16 horas a 37°C en medio LB sólido en presencia de la concentración adecuada del antibiótico correspondiente (ampicilina 50  $\mu$ g/ml, tetraciclina 12,5  $\mu$ g/ml, kanamicina 50  $\mu$ g/ml o cloranfenicol 10  $\mu$ g/ml; Sigma). Se amplificaron los clones que crecían selectivamente creciendo una colonia en medio LB líquido a 37°C durante aproximadamente 16 horas y en agitación.

Las bacterias seleccionadas se conservaron con glicerol estéril al 40% a -70°C.

### 4.1.3 Transformación bacteriana

Las bacterias se transformaron mediante electroporación, siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial del electroporador (MicroPulser, BioRad), empleando cubetas de 0,1 cm de diámetro (Cells Projects) previamente enfriadas en hielo. Se añadió una concentración aproximada de DNA de 5 ng para

plásmidos y 300 ng para BACs a las células competentes DH5 $\alpha$  y se incubaron durante 1 minuto en hielo. Seguidamente, las células se sometieron a un pulso eléctrico de 1,8 KV, 25  $\mu$ F y 20 Ohm, inmediatamente después se resuspendieron en medio SOC (MgSO<sub>4</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glucosa 20 mM, Bactotripton al 2%, Bacto extracto de levadura al 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM) y se incubaron a 37°C durante 1 hora en agitación. Tras este tiempo y para la selección de las células transformadas, se sembraron en medio LB sólido con el antibiótico correspondiente.

## 4.2 PLÁSMIDOS Y BACs

### 4.2.1 Vectores de clonaje

**pGEM-T.** (Promega) Vector linearizado, empleado para el clonaje de productos de PCR gracias a la presencia de una timidina terminal en ambos extremos 3'. Posee el gen de resistencia al antibiótico ampicilina. Contiene los promotores de los fagos T7 y SP6 flanqueando la región de clonaje múltiple, localizada dentro de la región que codifica para el  $\alpha$ -péptido de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, lo que permite la selección de recombinantes por el color (blanco o azul) de las colonias.

**pGEM-T Easy.** (Promega) De iguales características que el vector pGEM-T, pero con la adición de 15 pb que incorporan cuatro nuevas dianas de restricción a la región de clonaje múltiple.

**pUC18.** Vector de clonaje que replica en células procariotas. Posee el gen de resistencia al antibiótico ampicilina, además del gen *lacZ* que codifica para el fragmento amino-terminal de la enzima  $\beta$ -galactosidasa que producirá  $\alpha$ -complementación en la cepa bacteriana facilitando así su selección mediante X-Gal.

### 4.2.2 Plásmidos

**pEGFP-N1.** (Clontech) Plásmido que expresa la proteína EGFP, bajo el control del promotor de CMV, en células de mamíferos. Contiene los genes de resistencia a kanamicina y neomicina.

**pSD4-AG.** Contiene el promotor temprano de la glicoproteína gG de PRV, la región codificante de la proteína EGFP y el poliA de la gG de PRV (Muñoz y col., 2010).

**pZGF-SD4.** Contiene el promotor temprano de la glicoproteína gG de PRV, la región codificante de la proteína EGFP y el poliA de SV40 (Muñoz y col., 2010).

**pZTERGF.** Se obtuvo al reemplazar el promotor de la gG del plásmido pZGF-SD4 por el promotor hTERT (Piñero, 2009).

**pAZT180.** Expresa la proteína IE180 de PRV bajo el promotor inducible por tetraciclina (Ptet) (Muñoz y col., 2010).

**pATER180.** Se obtuvo al reemplazar el promotor Ptet del plásmido pAZT180 por el promotor hTERT (Piñero, 2009).

**ptetICP4lac.** Expresa la proteína ICP4 de HSV-1 bajo el control del promotor inducible por tetraciclina (Ptet) (Lerma y col., 2016a).

**pRIE180.** Plásmido que expresa la proteína IE180 bajo control de su propio promotor (Muñoz y col., 2010).

**pORIPAC.** Plásmido que contiene el OriS y las secuencias de empaquetamiento *pac1-pac2* de PRV y el gen de resistencia a ampicilina (Prieto y col., 2002).

**pORIPAC-GF.** Se obtuvo al insertar el casete de expresión de la proteína EGFP del plásmido pEGFP-N1 en el pORIPAC (Prieto y col., 2002).

**pOPC1.** Se obtuvo al insertar el promotor de CMV, la región de clonaje múltiple y el poliA procedentes del plásmido pCDNA3 (Invitrogen) en el pORIPAC (Diez, 2012).

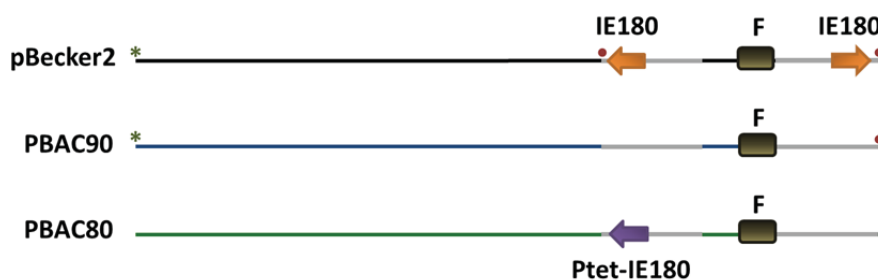
**pOZPAC.** Plásmido que contiene el OriS y las secuencias de empaquetamiento *pac1-pac2* de PRV y los genes de resistencia a zeocina y ampicilina (Muñoz y col., 2011).

**pOZPAC-GF.** Se obtuvo al insertar el casete de expresión de la proteína EGFP del plásmido pORIPAC-GF en el plásmido pOZPAC (Lerma y col., 2016a).

### 4.2.3 BACs

**PBAC90.** Cromosoma artificial de bacteria que contiene todo el genoma de PRV-Becker exceptuando las dos copias del gen de la IE180 (**Figura 8**) (Muñoz y col., 2011).

**PBAC80.** Cromosoma artificial de bacteria que contiene todo el genoma de PRV-Becker, pero solo tiene la copia del gen de la IE180 localizada en la región repetida interna del genoma y está regulado por el promotor inducible por tetraciclina (Ptet), además carece de las secuencias *pac1* y *pac2* de empaquetamiento (**Figura 8**) (Lerma y col., 2016b).



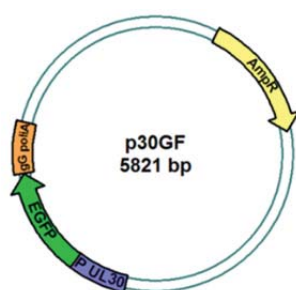
**Figura 8. Representación esquemática de los genomas lineales de los PBACs.** pBecker2 (Smith y Enquist, 2000) es el BAC parental de PRV a partir del que se obtuvieron PBAC90 y PBAC80. Se indican la delección de ambas copias del gen de IE180 (flechas naranjas) y de *pac1*-IRS (círculo) en el PBAC90 y la inserción de una copia de IE180 bajo control del promotor Ptet en la región IRS (flecha morada), la delección de las secuencias *pac1* y *pac2* (asterisco) en el PBAC80 y el replicón F (cuadrado verde) en los tres PBACs.

### 4.2.4 Obtención de plásmidos

#### 4.2.4.1 Plásmido p30GF

El plásmido p30GF (**Figura 9**), que lleva el promotor de la DNA polimerasa de PRV (gen UL30) controlando la expresión de la EGFP, se obtuvo a partir del plásmido pGEL30. El plásmido pGEL30 se obtuvo al clonar en el vector pGEM-T Easy el fragmento de 398 pb del promotor temprano de la DNA polimerasa de PRV (gen UL30), comprendido entre los nucleótidos -392 y +5 desde el codón de iniciación ATG. El

fragmento se amplificó por PCR con los cebadores PRPol-S y PRPol-AS. El cebador PRPol-S incluye en el extremo 5' la diana de la enzima de restricción XhoI, mientras que la secuencia del extremo 3' del cebador PRPol-AS lleva la diana de la enzima de restricción NcoI, además de incluir el codón de inicio ATG. Para la construcción del plásmido p30GF se digirió el plásmido pGEL30 con las enzimas XhoI y NcoI para liberar el fragmento del promotor de la DNA polimerasa que se clonó en el plásmido pSD4-AG previamente digerido con las enzimas XhoI y NcoI para reemplazar el promotor de la proteína gG de PRV por el promotor de la DNA polimerasa de PRV (Lerma y col., 2016a).



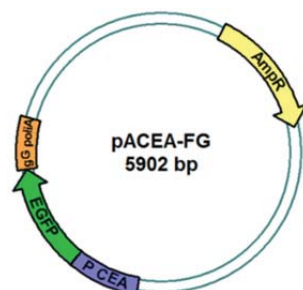
**Figura 9. Mapa circular del plásmido p30GF.** Se indica la posición del promotor de la DNA polimerasa de PRV (P UL30; cuadro morado), el gen de la EGFP (cuadro verde) y el gen de resistencia a ampicilina (AmpR; cuadro amarillo).

#### 4.2.4.2 Plásmido pACEA-FG

El plásmido pACEA-FG (**Figura 10**), que lleva el promotor del CEA regulando la expresión de la proteína EGFP, se obtuvo a partir del plásmido pGCEA-A. El plásmido pGCEA-A fue obtenido al clonar en el vector pGEM-T el fragmento de 482 pb del promotor del CEA (Schrewe y col., 1990), comprendido entre los nucleótidos -475 y +4 desde el codón de iniciación ATG. El fragmento se obtuvo mediante PCR a partir de DNA de amnios humano y con los cebadores CEA-S y CEA-AS. En el cebador CEA-S se incluye en el extremo 5' la diana de la enzima de restricción XhoI, mientras que la secuencia del extremo 3' del cebador CEA-AS lleva la diana de la enzima de restricción NcoI. Para la construcción del plásmido pACEA-FG, se digirió el plásmido pGCEA-A con las enzimas XhoI (diana rellena posteriormente, haciendo un extremo romo) y NcoI



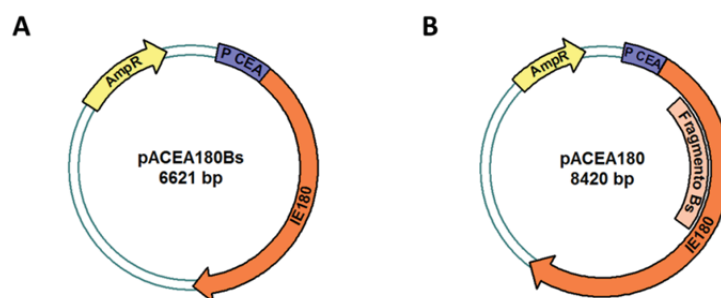
para liberar el fragmento del promotor del CEA que se clonó en el plásmido pZGF-SD4 previamente digerido con las enzimas *StuI* y *NcoI*, sustituyéndose así el promotor de la gG por el del CEA (Lerma y col., 2016a).



**Figura 10. Mapa circular del plásmido pACEA-FG.** Se indica la posición del promotor del CEA (cuadro morado), el gen de la EGFP (cuadro verde) y el gen de resistencia a ampicilina (AmpR; cuadro amarillo).

#### 4.2.4.3 Plásmido pACEA180

El plásmido pACEA180 (**Figura 11B**), que lleva el promotor del CEA regulando la expresión de la proteína IE180 de PRV, se obtuvo a partir del pAZT180Bs (**Figura 11A**). Éste plásmido se obtuvo al eliminar un fragmento de 1.799 pb del plásmido pAZT180 por digestión con la enzima *BstEII*. Este fragmento, denominado fragmento Bs, contiene una de las dos dianas *NcoI* del plásmido. Para la construcción del plásmido pACEA180, se digirió el plásmido pGCEA-A con las enzimas *XhoI* (diana rellenada posteriormente, haciendo un extremo romo) y *NcoI* para liberar el fragmento del promotor del CEA que se clonó en el plásmido pAZT180Bs previamente digerido con las enzimas *EcoRI* (diana rellenada posteriormente, haciendo un extremo romo) y *NcoI*, sustituyéndose así el promotor *Ptet* por el del CEA. A continuación se le insertó al plásmido el fragmento Bs, recuperando así su estructura original con dos dianas *NcoI* (Lerma y col., 2016a).



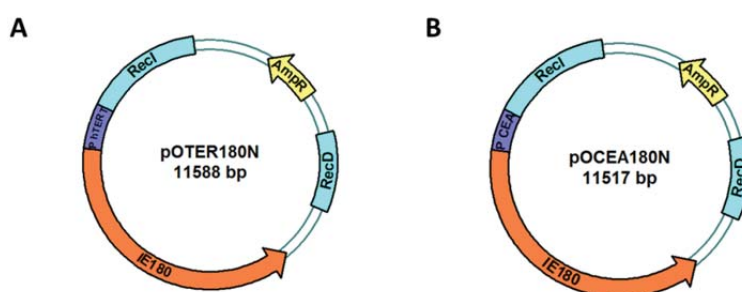
**Figura 11. Mapa circular de los plásmidos pCEA180Bs y pCEA180.** **A.** Plásmido pCEA180Bs, se indica la posición del promotor del CEA (cuadro morado), el gen de la IE180 sin el fragmento Bs (cuadro naranja) y el gen de resistencia a ampicilina (AmpR; cuadro amarillo). **B.** Plásmido pCEA180, se indica la posición del promotor del CEA (cuadro morado), el gen de la IE180 (cuadro naranja), fragmento Bs (cuadro rosa) y el gen de resistencia a ampicilina (AmpR; cuadro amarillo).

#### 4.2.4.4 Plásmido pOZPAC-GF-N

El plásmido pOZPAC-GF-N se obtuvo al eliminar una diana NdeI del plásmido pOZPAC-GF. Este plásmido se obtuvo al insertar en el pOZPAC (Muñoz y col., 2011), digerido con la enzima NotI, el fragmento de 1.700 pb procedente del plásmido pORIPAC-GF (Muñoz y col., 2006) digerido con NotI y que contiene el gen de la EGFP bajo el control del promotor inmediatamente temprano de citomegalovirus (IE-CMV). El pOZPAC-GF, se digirió con la enzima FspI para eliminar el fragmento que lleva la diana NdeI (localizada en el nucleótido 2.184, que pertenece al pUC18 usado como vector) y parte del gen de resistencia a ampicilina. Este fragmento fue sustituido por el fragmento FspI del plásmido pUC18M, en el que se ha eliminado la diana NdeI. El plásmido pUC18M se obtuvo al digerir el pUC18 con la enzima NdeI, rellenar los extremos cohesivos y religar los nuevos extremos romos, perdiéndose así la diana para la enzima NdeI (Lerma y col., 2016a).

#### 4.2.4.5 Plásmidos pOTER180N y pOCEA180N

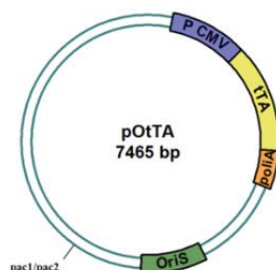
Para la construcción de los plásmidos pOTER180N (**Figura 12A**) y pOCEA180N (**Figura 12B**), se digirieron los plásmidos pATER180 y pACEA180 con las enzimas *Asel* y *MluI*, liberándose un fragmento que lleva la construcción del promotor tumoral controlando la expresión de la proteína IE180. Los fragmentos obtenidos, se insertaron en el plásmido pOZPAC-GF-N, previamente digerido con *MluI* y *NdeI*, obteniéndose así el plásmido pOTER180N (11.588 pb) y el plásmido pOCEA180N (11.517 pb) (Lerma y col., 2016a).



**Figura 12. Mapa circular de los plásmidos pOTER180N y pOCEA180N.** **A.** Plásmido pOTER180N, donde se indica la posición del promotor de hTERT (cuadro morado), el gen de la IE180 (flecha naranja), las dos zonas de recombinación derecha e izquierda (RecI y RecD; cuadros azules) y el gen de resistencia a ampicilina (AmpR; cuadro amarillo). **B.** Plásmido pOCEA180N, donde se indica la posición del promotor del CEA (cuadro morado), el gen de la IE180 (flecha naranja), las dos zonas de recombinación derecha e izquierda (RecI y RecD; cuadros azules) y el gen de resistencia a ampicilina (AmpR; cuadro amarillo).

#### 4.2.4.6 Plásmido pOtTA

El plásmido pOtTA (**Figura 13**), que codifica la secuencia tTA bajo el control del promotor de CMV, se obtuvo a partir del plásmido pUHD15-1 (Gossen y Bujard, 1992). El casete de expresión del tTA se obtuvo al digerir el pUHD15-1 con las enzimas *NcoI* y *BamHI* y se insertó, tras rellenar la diana *BamHI*, en el plásmido pOPC1 previamente digerido con *NcoI* y *EcoRV*, obteniéndose así el plásmido pOtTA.



**Figura 13. Mapa circular del plásmido pOtTA.** Se indica la posición del promotor de CMV (cuadro morado), el gen del transactivador tTA (cuadro amarillo), el poliA (cuadro naranja), el OriS (cuadro verde) y la zona de unión entre *pac1* y *pac2*.

### 4.3 CULTIVOS CELULARES EUCARIOTAS

#### 4.3.1 Líneas celulares eucariotas

**Vero.** Células epiteliales de riñón de mono verde africano. Mantenidas en medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco) suplementado con 5% de STF.

**HeLa.** Células procedentes de adenocarcinoma de cérvix humano. Mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de STF.

**HeLa Tet-Off.** (Clontech) Células HeLa que expresan el transactivador controlado por tetraciclina (tTA). Empleadas para la transfección de DNA gracias a su alta eficiencia con el método empleado. Mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de STF y G418 100 µg/ml.

**U2OS.** Células procedentes de osteosarcoma humano. Mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de STF.

**HT29.** Células procedentes de adenocarcinoma de colon humano. Mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de STF. Cedidas por el Dr. Ignacio Gadea, Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

**FP.** Fibroblastos de pulmón humano. Mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de STF.

**HPDE.** Células epiteliales del conducto pancreático humano (Liu y col., 1998). Mantenidas en medio DMEM/F12.

**Células primarias de cáncer de páncreas.** Las distintas líneas se refieren mediante el número de paciente del que proceden (185, 215, 253 y 354) (Mueller y col., 2009). Mantenidas en medio RPMI con 10% de STF.

**PK15.** Células epiteliales de riñón de cerdo. Mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de STF.

**PK15-IE180.** Células PK15 que expresan la proteína IE180 de PRV bajo el promotor inducible por tetraciclina. Mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% STF y G418 500 µg/ml y doxiciclina 2 µg/ml cuando era necesario inducir la expresión de la IE180. Ceditas por el Dr. Anthony Zador, Watson School of Biological Sciences, USA (Oyibo y col., 2014).

**Panc1.** Células procedentes de adenocarcinoma ductal de páncreas humano. Mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de STF.

**Huh7.** Células procedentes de hepatocarcinoma humano. Mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de STF.

**H441.** Células procedentes de adenocarcinoma de pulmón humano. Mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de STF.

#### **4.3.2 Mantenimiento y conservación de líneas celulares eucariotas**

Los cultivos celulares se crecieron en medio DMEM, suplementado con STF (Gibco; en una concentración determinada para cada tipo celular), además de los siguientes antibióticos: penicilina 100 UI/ml (Gibco), estreptomicina 0,05 mg/ml (Gibco), sulfato de gentamicina 0,05 mg/ml (Gibco) y anfotericina B 1 µg/ml (Gibco). Tamponado con bicarbonato al 0,15% y HEPES 15 mM (Serva).

Las células HPDE se crecieron en medio DMEM/F12 (Gibco), suplementado con antibióticos en las mismas condiciones que el DMEM, glutamina 0,6 mg/ml (Gibco), suplemento B27 (Gibco) y FGF-2 (CellGS).

Las células de cáncer de páncreas se crecieron en medio RPMI (Gibco), suplementado con anfotericina B 1 µg/ml, penicilina 100 U.I./ml, estreptomicina 0,05 mg/ml y STF al 10%.

El suero de ternera fetal se inactiva (STFI) en un baño a 56°C durante 30 minutos.

Las células eucariotas se mantuvieron mediante pases sucesivos, creciéndolas en botellas Falcon (Becton Dickinson) hasta su confluencia, en incubadores a 37°C y con una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. En este momento, se lavaba la monocapa con PBS 1x, se desprendían las células con tripsina (Gibco)-EDTA (Merck) y se resuspendían con medio de cultivo DMEM. Una parte de estas células se sembraban de nuevo en medio fresco para mantener el cultivo.

Las células se conservaron mediante criogenización en criotubos estériles (Corning), en medio de cultivo DMEM con DMSO al 10% (Sigma) a una concentración de 4x10<sup>6</sup> células/ml. Primero se congelaban a -70°C durante 48 horas, a continuación se pasaban a nitrógeno líquido (-196°C) para su conservación.

#### **4.3.3 Transfección por lipofectamina**

Para la transfección del DNA en células eucariotas se empleó lipofectamina 2.000 (Invitrogen), basada en la formación de liposomas entre lípidos catiónicos y el DNA (Muñoz y col., 2010).

Las células HeLa Tet-Off y U2OS, del orden de 250.000 células/ml, y PK15, del orden de 200.000 células/ml, fueron cultivadas 24 horas antes en frascos de 12,5 cm<sup>2</sup>, en el momento de la transfección presentaban una confluencia aproximada del 90%. La monocapa se incubó durante 5 horas con la concentración correspondiente de DNA y 10 µl de lipofectamina 2.000 en 1 ml de medio DMEM sin suero ni antibióticos. Transcurrido este tiempo, se sustituyó el medio por medio fresco con suero y antibióticos.

Transcurridas 24 horas tras la transfección, las células se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse TS100).

#### 4.3.4 Fijación de células para citometría de flujo

Las células transfectadas se fijaban para su posterior análisis por citometría de flujo. Para ello, en primer lugar, las células se desprendían e individualizaban con tripsina-EDTA y se fijaban en paraformaldehído 4% (Sigma). Las células se conservaban en  $\text{ClNH}_4$  0,05 M (Merck) hasta su uso (Muñoz y col., 2010).

La fluorescencia emitida por la proteína EGFP (excitación a 488 nm y emisión a 508 nm) se midió en el citómetro de flujo Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter). La intensidad de fluorescencia media se calculó a partir de los datos recogidos en tres experimentos independientes en los que se midió la intensidad emitida por las células transfectadas positivas para fluorescencia.

#### 4.4 VIRUS

##### 4.4.1 Cepas víricas

**R120vGF.** Virus recombinante derivado de la cepa d120 de HSV-1 que es deficiente en la expresión de la proteína ICP4. Expresa la proteína EGFP (Bello-Morales y col., 2014).

**PRV-NIA3.** Cepa virulenta de PRV (McFerran y Dow, 1975).

**XGF-N.** Virus PRV recombinante defectivo en la glicoproteína gG. Expresa la proteína EGFP bajo control del promotor de la gG (Viejo-Borbolla y col., 2010).

**vBecker2.** Generado al transfectar el plásmido pBecker2 (**Figura 8**) (Smith y Enquist, 2000) en células HeLa Tet-Off. Deriva de la cepa virulenta PRV-Becker.

**PRV-BT90.** Virus PRV recombinante que posee una única copia de la proteína IE180 controlada por el promotor inducible por tetraciclina (Ptet). Obtenido a partir del PBAC90 (Muñoz y col., 2011).

**PRV-BT80GF.** Virus PRV recombinante que posee una única copia de la proteína IE180 controlada por el promotor inducible por tetraciclina (Ptet). Expresa la proteína

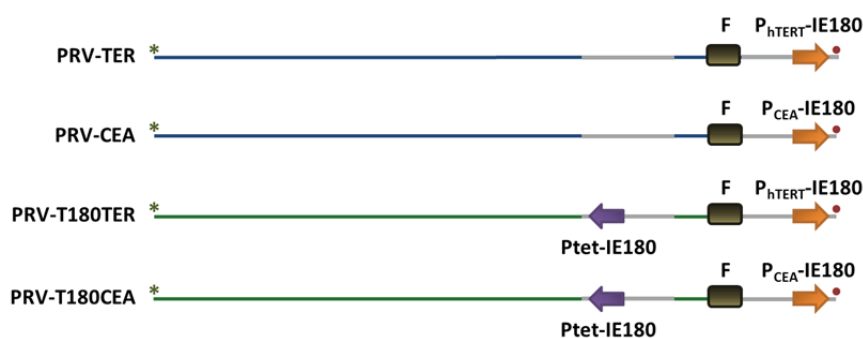
EGFP bajo control del promotor de CMV. Obtenido al cotransfectar el fragmento purificado PvuII-BspHI del plásmido pOZPAC-GF con el PBAC80 (Lerma y col., 2016).

**N1aHTK.** Virus PRV recombinante que posee el gen de la TK de HSV-1 (Gómez-Sebastián y Tabarés, 2004).

#### 4.4.2 Obtención de virus recombinantes

##### 4.4.2.1 PRV-TER

El virus recombinante PRV-TER (**Figura 14**) se obtuvo al digerir 5 µg del plásmido pOTER180NC con las enzimas ApaI y KpnI, liberándose así el fragmento que contiene las dos regiones de recombinación homóloga entre las que se encuentra el casete formado por el promotor hTER y la proteína IE180. A continuación, se cotransfectaron células U2OS con 1,5 µg del plásmido digerido y 4 µg del PBAC90. Tras una semana de incubación en la que se fueron desarrollando focos de infección en la monocapa, se congelaron las células a -70°C para su posterior descongelación a 37°C y sonicación. Los virus recombinantes obtenidos se fueron enriqueciendo tras tres pases en células U2OS (Lerma y col., 2016a).



**Figura 14. Representación esquemática de los genomas lineales de los virus recombinantes.** Se indican la copia del gen de IE180 bajo control de los promotores tumorales hTERT o CEA en la región TRS (flechas naranjas), la copia de IE180 bajo control del promotor Ptet en la región IRS (flecha morada), las secuencias *pac1* (círculo) y *pac2* (asterisco) y el replicón F (cuadrado verde).



#### 4.4.2.2 PRV-CEA

El virus recombinante PRV-CEA (**Figura 14**) se obtuvo al digerir 5 µg del plásmido pOCEA180N con las enzimas ApaI y KpnI, liberándose así el fragmento que contiene las dos regiones de recombinación homóloga entre las que se encuentra el casete formado por el promotor del CEA y la proteína IE180. A continuación, se cotransfectaron células U2OS con 1,5 µg del plásmido digerido y 4 µg del PBAC90. Tras una semana de incubación en la que se fueron desarrollando focos de infección en la monocapa, se congelaron las células a -70°C para su posterior descongelación a 37°C y sonicación. Los virus recombinantes obtenidos se fueron enriqueciendo tras cuatro pases en células U2OS (Lerma y col., 2016a).

#### 4.4.2.3 PRV-T180TER

El virus recombinante PRV-T180TER (**Figura 14**) se obtuvo al digerir 5 µg del plásmido pOTER180NC con las enzimas ApaI y KpnI, liberándose así el fragmento que contiene las dos regiones de recombinación homóloga entre las que se encuentra el casete formado por el promotor hTER y la proteína IE180. A continuación, se cotransfectaron células Vero con 1 µg del plásmido digerido y 4 µg del PBAC80. A las 48 horas se comenzó a ver efecto citopático en el cultivo. Tras 96 horas de incubación, en las que se desarrollaron focos de infección en la monocapa, se congelaron las células a -70°C para su posterior descongelación a 37°C y sonicación. Los virus recombinantes obtenidos se purificaron por clonación en células HeLa Tet-Off.

#### 4.4.2.4 PRV-T180CEA

El virus recombinante PRV-T180CEA (**Figura 14**) se obtuvo al digerir 5 µg del plásmido pOCEA180N con las enzimas ApaI y KpnI, liberándose así el fragmento que contiene las dos regiones de recombinación homóloga entre las que se encuentra el casete formado por el promotor del CEA y la proteína IE180. A continuación, se cotransfectaron células Vero con 1 µg del plásmido digerido y 4 µg del PBAC80. A las 48 horas se comenzó a ver efecto citopático en el cultivo. Tras 96 horas de incubación,

en las que se desarrollaron focos de infección en la monocapa, se congelaron las células a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior descongelación a  $37^{\circ}\text{C}$  y sonicación. Los virus recombinantes obtenidos se purificaron por clonación en células HeLa Tet-Off.

#### **4.4.3 Producción y conservación de virus**

Para la preparación de “stock” de virus, se infectaban monocapas subconfluentes de células, en frascos de cultivo de  $75\text{ cm}^2$ , a una MOI de 0,05. Tras aproximadamente 48 horas post-infección (o cuando se observaba un efecto citopático total) se suplementaba el medio con STF inactivado (STFI) hasta el 20% y se congelaban los frascos a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente, se descongelaban en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  y se centrifugaba el volumen a 5.000 rpm durante 5 minutos, guardando el sobrenadante. El sedimento se resuspendía con sobrenadante guardado y se sonicaba en sonicador de baño (Branson Sonifier 450) durante 2 minutos, favoreciendo así la rotura celular. Se centrifugaba de nuevo a 5.000 rpm durante 5 minutos y se recogía el sobrenadante. Finalmente, se alicuoteaban todos los sobrenadantes recogidos y se conservaban a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4.4 Crecimiento de virus**

Las infecciones víricas se realizaron en monocapas de cultivos celulares con la multiplicidad de infección (MOI) de virus deseada, incubando durante 90 minutos para la adsorción del virus. Tras la incubación, se retiraba el inóculo vírico, se lavaban las células con PBS 1x y se añadía el volumen correspondiente de medio DMEM suplementado con STF y se incubaba durante el tiempo deseado. Transcurrido este tiempo, se suplementaba el medio con STFI hasta el 20% y se congelaban los frascos a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Las células se sembraban en frascos de cultivos de  $12,5\text{ cm}^2$  con 2,5 ml de medio, 24 horas antes de las infecciones y del orden de: 200.000 células/ml para células FP, Vero, Panc1, Huh7 y H441; 250.000 células/ml para células HeLa Tet-Off, HeLa, U2OS, HT29, HPDE, 215 y 354; y 125.000 células/ml para células 185.

#### 4.4.5 Producción de amplicones

La producción de amplicones se realizó mediante la transfección de células Vero con 5 µg del plásmido pOtTA. A las 24 horas post-transfección, las células se infectaron con el virus PRV-BT80GF a una MOI de 0,1. A las 48 horas post-infección, se suplementaba el medio con STFI hasta el 20% y se congelaban los frascos a -70°C.

#### 4.4.6 Titulación de virus

La titulación se realizó por dosis infecciosa 50 (CTDI<sub>50</sub>) en cultivos de células HeLa Tet-Off o U2OS. Para ello, se realizaron diluciones seriadas en base 10 del virus a titular, usando medio DMEM suplementado con STF al 10%. Se inocularon 50 µl de cada dilución, por quintuplicado, en placas de 96 pocillos, previamente sembradas con 250.000 células/ml en un volumen de 100 µl por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 48-72 horas. Tras este tiempo, se observó el efecto citopático producido por los virus al microscopio (Nikon Eclipse TS100). En función de la ausencia o presencia de efecto citopático, se calculó el título siguiendo el método de Reed-Muench (Reed y Muench, 1938), el cual se expresó como CTDI<sub>50</sub>/ml.

Los “stocks” de los virus recombinantes PRV-T180TER y PRV-T180CEA se produjeron y titularon en células HeLa Tet-Off para favorecer la activación del promotor Ptet, obteniéndose títulos del orden de magnitud de 10<sup>7</sup> CTDI<sub>50</sub>. Mientras que los “stocks” de los recombinantes PRV-TER y PRV-CEA se produjeron y titularon en células U2OS, obteniéndose títulos del orden de magnitud de 10<sup>6</sup> CTDI<sub>50</sub> para PRV-TER y 10<sup>4</sup> CTDI<sub>50</sub> para PRV-CEA.

Para la titulación de los amplicones se empleó un ratio amplicón/virus de 1/10 (Lerma y col., 2016b).

## 4.5 ANÁLISIS DE APOPTOSIS

Para los análisis de apoptosis se emplearon células U2OS y PK15-IE180, del orden de 250.000 células/ml, cultivadas en frascos de 12,5 cm<sup>2</sup>, que en el momento de su uso presentaban una confluencia aproximada del 90%. Las células U2OS se infectaron a una MOI de 0,2 y se recogieron a las 24 horas post-infección. Las células PK15-IE180 se incubaron en presencia de doxiciclina para inducir la expresión de la IE180 y se recogieron a las 48 horas post-inducción.

Para la detección de las células apoptóticas se empleó un marcaje con anexina V conjugada con APC (BD Biosciences). Las células se desprendían e individualizaban con tripsina-EDTA y se incubaban con anexina V-APC en oscuridad durante 20 minutos. A continuación, las células se trataban con DAPI. Los niveles de apoptosis se midieron en el citómetro de flujo BD FACSCanto™ (BD Biosciences). Los datos recogidos se analizaron con el programa FlowJo 8.7 (FlowJo, LLC Data Analysis Software). Los niveles de apoptosis temprana y apoptosis tardía se determinaron como el porcentaje de anexina V<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> y anexina V<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>, respectivamente (Miranda-Lorenzo y col., 2014).

## 4.6 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE DNA

### 4.6.1 Aislamiento de DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico, para el análisis de clonajes, se realizó mediante lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001).

Para obtener DNA de mayor pureza se empleó, para concentraciones inferiores a 20 µg, el QIAprep Spin Miniprep Kit y, para concentraciones superiores a 100 µg, el QIAfilter Midi Kit (ambos de Qiagen), siguiendo para ello las recomendaciones de la casa comercial.

### 4.6.2 Aislamiento de DNA de BAC

La extracción del DNA de BACs se realizó mediante el Large-Construct Kit (Qiagen), siguiendo para ello las recomendaciones de la casa comercial.

#### 4.6.3 Aislamiento de DNA vírico

La extracción del DNA vírico encapsidado se realizó a partir de cultivos celulares infectados a MOI 0,05 por tratamiento con fenol y proteinasa K (Tabarés, 1987).

#### 4.6.4 Amplificación por PCR

La mezcla de reacción contenía una concentración final 1x de los buffers Q y 10x (Qiagen), HotStar Taq DNA polimerasa 2 unidades (Qiagen), cebadores 1  $\mu$ M (sintetizados por Roche), 10 mM de cada dNTP (Applied Biosystems). El volumen final de la reacción fue de 50  $\mu$ l.

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización y activación de la enzima de 15 minutos a 95°C seguido de 33 ciclos, cada uno de los cuales comprende pasos de desnaturalización de la doble hebra de DNA de 1 minuto a 95°C, hibridación de los cebadores de 1 minuto a una temperatura específica para cada cebador y elongación de 1 minuto a 72°C seguidos de un último paso de 7 minutos a 72°C para una mayor elongación.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 de Perkin Elmer.

Las parejas de cebadores empleadas en este trabajo, su secuencia y el tamaño del fragmento, pueden verse detallados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Pares de cebadores empleadas en las reacciones de PCR.

DNA polimerasa PRV	DNApol-D	5'-GTGGAGGTCAACTGCACG-3'	523 pb
	DNApol-R	5'-GCGACGGCGTACATGTCC-3'	
Promotor DNA polimerasa PRV	PRPol-S	5'-CTCGAGCAGCGCCAGCAGG-3'	398 pb
	PRPol-AS	5'-CCATGGCTCGTCCCACG-3'	
Promotor IE180 + IE180 PRV	P180-S	5'-TCTGATTGGCTCGCTAGC-3'	1021 pb
	180-AS	5'-GGCCGAAGAGGAGATCCTCG-3'	
Promotor hTERT	TERT-2D	5'-CGCGTCCGGACCTGGAGG-3'	553 pb
	TERT-2R	5'-GCGCCATGGCGGGGTGG-3'	
Promotor CEA	CEA-S	5'-CTCGAGCCACCTCTGTCACC-3'	482 pb
	CEA-AS	5'-CCATGGTCTCTGCTGTCTGC-3'	
Promotor hTERT + IE180	TERT-2D	5'-CGCGTCCGGACCTGGAGG-3'	710 pb
	180-AS	5'-GGCCGAAGAGGAGATCCTCG-3'	
Promotor CEA + IE180	CEA-S	5'-CTCGAGCCACCTCTGTCACC-3'	636 pb
	180-AS	5'-GGCCGAAGAGGAGATCCTCG-3'	
Sec. líder hTERT + IE180	L-hTERT	5'-TGCTGCGCACGTGGGAAGC-3'	207 pb
	180-AS	5'-GGCCGAAGAGGAGATCCTCG-3'	
Sec. líder CEA + IE180	L-CEA	5'-AGCTCTTCTCCACAGAGG-3'	208 pb
	180-AS	5'-GGCCGAAGAGGAGATCCTCG-3'	
Gen GAPDH	GAPDH-S	5'-CCACCCATGGCAAATTCC-3'	587 pb
	GAPDH-AS	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGG-3'	

#### **4.6.5 Purificación de productos de PCR**

Para la purificación de productos de PCR se emplearon los Montage PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore), siguiendo para ello las recomendaciones de la casa comercial.

#### **4.6.6 Secuenciación automática**

Se empleó el servicio de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de la Universidad Autónoma de Madrid. Para ello, se precipitaron entre 200 - 500 ng de DNA con etanol absoluto y se resuspendió en agua.

#### **4.6.7 Análisis por enzimas de restricción**

Las digestiones del DNA realizadas mediante endonucleasas de restricción se hicieron en las condiciones recomendadas por la casa comercial (Biolabs, Roche y Amersham Biosciences).

#### **4.6.8 Electroforesis en geles de agarosa**

Las muestras de DNA plasmídico y vírico digeridas mediante enzimas de restricción se analizaron en geles de agarosa al 0,75% con bromuro de etidio 0,1 µg/ml (Serva). Los resultados se observaron con un transiluminador de luz UV. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% en las mismas condiciones. Se empleó el marcador de tamaño molecular para DNA, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

## **4.7 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE RNA**

### **4.7.1 Aislamiento de RNA total**

La extracción del RNA total a partir de cultivos celulares o cultivos infectados a MOI 0,05, se realizó mediante el RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen), siguiendo para ello las recomendaciones de la casa comercial, o mediante el método de tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). Tras la extracción, las muestras se trataban con el DNA-free Kit (Ambion), para eliminar las posibles contaminaciones con DNA. Además, se comprobó por PCR que no había contaminación de DNA en las muestras (Muñoz y col., 2010).

### **4.7.2 Electroforesis en geles de agarosa**

Las muestras de RNA obtenidas se analizaron en geles desnaturalizantes de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio 0,1 µg/ml, formaldehído 6% (Sigma) y BER 1x (MOPS 20 mM (Sigma), AcNa 8 mM (Merck) y EDTA 1 mM (Merck)).

Previo a su análisis, se añadió a 1 µg de RNA, formamida 50% (Calbiochem), BER 1x, formaldehído 7% y bromuro de etidio 0,25 mg/ml (Camacho y Tabarés, 1996). Las muestras se calentaron a 55°C durante 15 minutos y se enfriaron en hielo hasta su uso.

### **4.7.3 Reacción de RT-PCR**

Para la obtención de cDNA a partir de las muestras obtenidas de RNA, se empleó el First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), siguiendo para ello las recomendaciones de la casa comercial. Cada mezcla de reacción contenía 2 µg de RNA y 0,04 Unidades (1,6 µg) del primer Oligo (dT).

Las condiciones de reacción de RT fueron las siguientes: un ciclo de 10 minutos a 65°C para desnaturalizar las estructuras secundarias del RNA, 30 minutos a 55°C para la retrotranscripción del RNA y 5 minutos a 85°C para inactivar la enzima RT.

Para la reacción de PCR se emplearon las mismas concentraciones de reactivos y condiciones que en el apartado 4.6.4.



#### 4.7.4 Reacción de RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RTqPCR)

Para la obtención de cDNA a partir de 1 µg de RNA, se empleó el QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen), siguiendo para ello las recomendaciones de la casa comercial. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un primer ciclo de 5 minutos a 42°C para eliminar las posibles contaminaciones con DNA, un segundo ciclo de 15 minutos a 42°C para la retrotranscripción del RNA y 3 minutos a 92°C para inactivar la enzima RT.

Las reacciones de RTqPCR se llevaron a cabo en el termociclador Real-Time PCR StepOnePlus™ (Applied Biosystems) empleando FAST-SYBR Green (Applied Biosystems), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Cada mezcla de reacción contenía 15 ng de cDNA, FAST-SYBR Green 1x y cebadores 0,25 µM. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de desnaturalización (15 segundos a 95°C) e hibridación/elongación (1 minuto a 65°C).

**Tabla 2. Parejas de cebadores empleadas en las reacciones de qPCR.**

<b>IE180 PRV</b>	q180-S	5'-CGCCCTTCGAGACCAGCGT-3'	122 pb
	q180-AS	5'-GAAGCCGACGATCTCCACCGC-3'	
<b>Gen β-actina</b>	Huβ-actin For	5'-GCGAGCACAGAGCCTCGCCTT-3'	125 pb
	Huβ-actin Rev	5'-CATCATCCATGGTGAGCTGGCGG-3'	

## Resultados

---

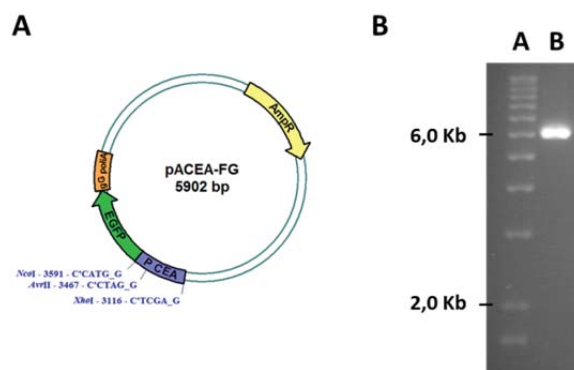
## 5.1 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS PROMOTORES hTERT Y CEA

La sustitución de secuencias reguladoras de la transcripción endógenas en el genoma vírico por promotores que son preferentemente activos en células tumorales es un método empleado para obtener especificidad tumoral en virus oncolíticos (Hernández-Alcoceba, 2011). Antes de crear un virus oncolítico mediante esta estrategia es esencial realizar una serie de experimentos a nivel genético que garanticen su correcto funcionamiento, para ello hay que identificar la región mínima y activa del promotor tumoral y confirmar si esta región seleccionada es funcional.

### 5.1.1 Estudio de la actividad de los promotores mediante la expresión de EGFP

#### 5.1.1.1 Caracterización de los plásmidos pGCEA-A y pACEA-FG

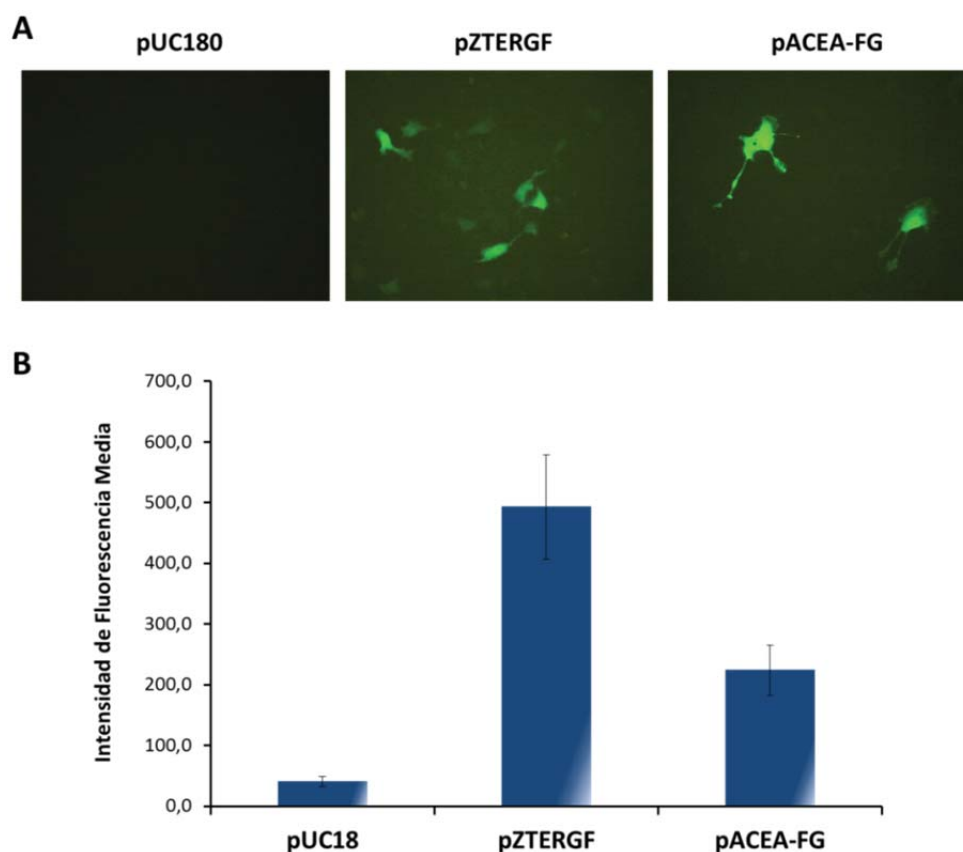
El plásmido pACEA-FG se construyó a partir del pGCEA-A, con el objetivo de expresar la proteína EGFP bajo el control del promotor tumoral del CEA, pudiendo así emplearlo para analizar la actividad del promotor. La caracterización de ambos plásmidos se llevó a cabo mediante secuenciación (cebadores CEA-S y CEA-AS), confirmándose la correcta secuencia del promotor del CEA. Además, el plásmido pACEA-FG (5,9 Kb) se caracterizó por digestión enzimática con la enzima AvrII, que lineariza el plásmido originando un único fragmento (**Figura 15**), confirmando la incorporación del promotor en el “reporter vector”.



**Figura 15. Caracterización del plásmido pACEA-FG.** **A.** Mapa de restricción del plásmido pACEA-FG donde se indica la posición de las dianas de restricción NcoI, XhoI, empleadas para su construcción, y AvrII, empleada para su caracterización. **B.** Marcador de tamaño de DNA 1 Kb Ladder (**carril A**); pACEA-FG digerido con AvrII que origina un único fragmento de 5,9 Kb (**carril B**).

#### 5.1.1.2 Análisis de la expresión de EGFP bajo promotores tumorales

La EGFP se utilizó como proteína marcadora para estudiar la funcionalidad de los promotores tumorales hTERT y CEA clonados en los plásmidos pACEA-FG y PZTERGF (Piñero, 2009). Para ello, se transfectaron los plásmidos pZTERGF y pACEA-FG en células HeLa Tet-Off. La expresión de la EGFP se detectó por microscopía de fluorescencia a las 24 horas post-transfección (**Figura 16A**). Las células se fijaron a las 24 horas y se valoró la expresión de la EGFP mediante citometría de flujo. Se observó que ambos promotores tumorales son funcionales al haber expresión de la EGFP, detectándose el doble de fluorescencia en el pZTERGF que en el pACEA-FG (**Figura 16B**). El plásmido pUC18 se empleó como control negativo de fluorescencia y para marcar el fondo de detección.



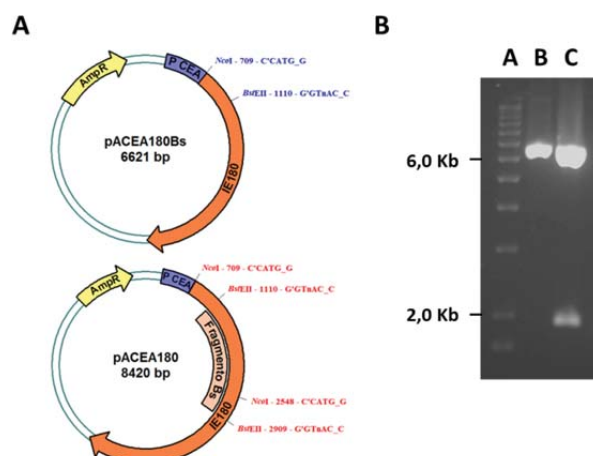
**Figura 16.** Análisis funcional de los promotores hTERT y CEA a través de la expresión de la EGFP. Transfección de los plásmidos pZTERGF y pACEA-FG en células HeLa Tet-Off. El plásmido pUC18 se empleó como control negativo. **A.** Imágenes de las transfecciones obtenidas por microscopía de fluorescencia 24 horas post-transfección. **B.** Datos de la medición por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia media de las transfecciones a las 24 horas.

### 5.1.2 Expresión de la proteína IE180 bajo control de promotores tumorales

#### 5.1.2.1 Caracterización de los plásmidos pACEA180Bs y pACEA180

El plásmido pACEA180 se construyó para expresar la proteína IE180 de PRV bajo el control del promotor tumoral del CEA, para analizar su funcionalidad y sus niveles de expresión, de cara al objetivo de obtener virus oncolíticos cuya IE180 esté controlada por promotores tumorales humanos. La caracterización de ambos plásmidos se llevó a cabo mediante digestión con enzimas de restricción (**Figura 17**). Se empleó la enzima NcoI, que lineariza el plásmido pACEA180Bs (6,6 Kb) y que origina dos fragmentos en el plásmido pACEA180 (8,4 Kb), uno de 1,8 Kb y otro de 6,6 Kb,

confirmando la inserción del fragmento Bs. El plásmido pACEA180Bs se caracterizó también por secuenciación (cebadores CEA-S y CEA-AS), confirmándose la correcta secuencia del promotor del CEA.



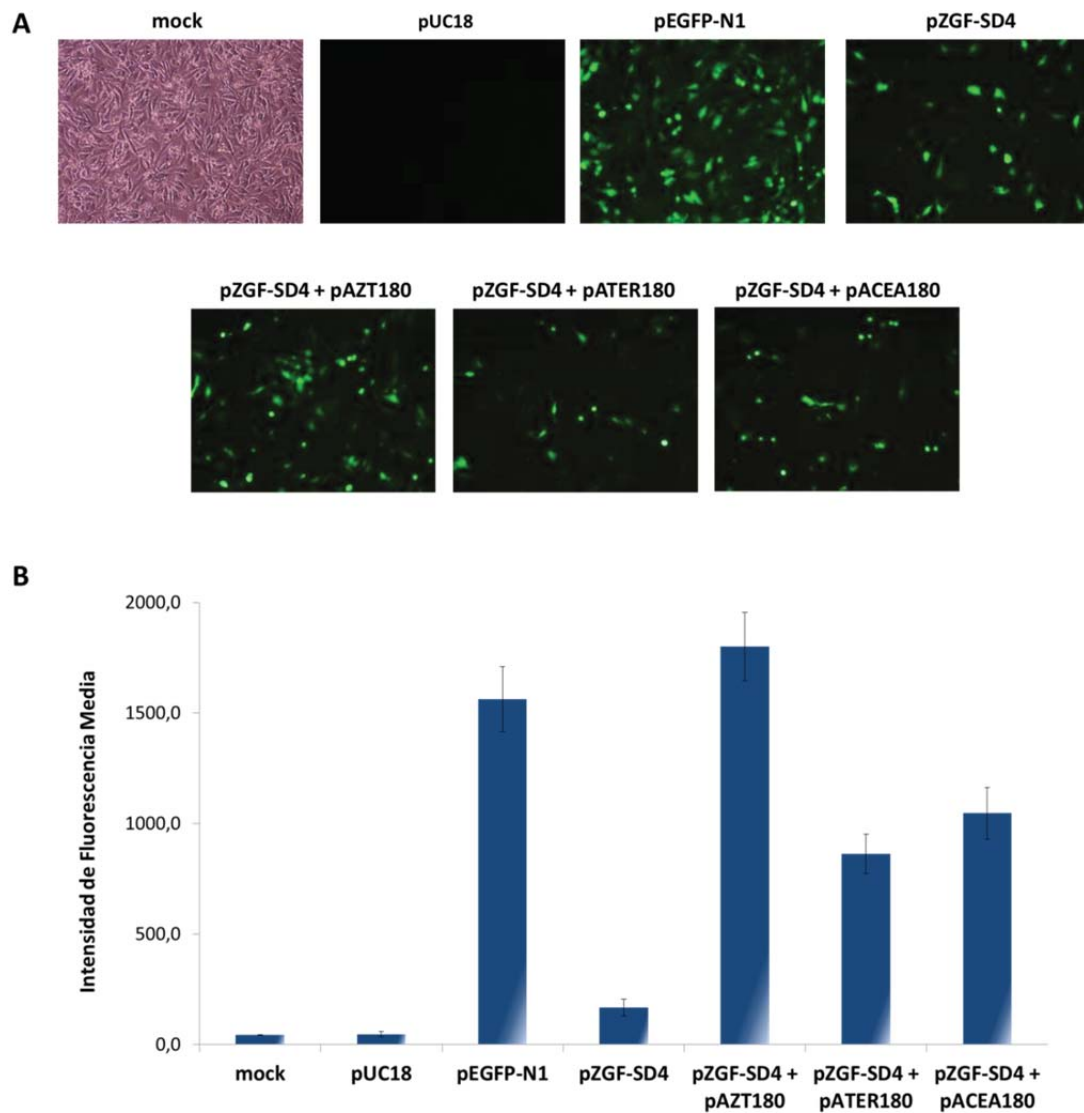
**Figura 17. Caracterización de los plásmidos pACEA180Bs y pACEA180.** **A.** Mapas de restricción de los plásmidos pACEA180Bs y pACEA180, donde se indica la posición de las dianas de restricción NcoI, empleada para su caracterización, y BstEII, empleada para la inserción del fragmento Bs. **B.** Marcador de tamaño de DNA 1 Kb Ladder (**carril A**); pACEA180Bs digerido con NcoI que origina un único fragmento de 6,6 Kb (**carril B**); pACEA180 digerido con NcoI que origina dos fragmentos de 1,8 y 6,6 Kb (**carril C**).

#### 5.1.2.2 Análisis de la transactivación de la expresión de EGFP por promotores tumorales

La expresión de la IE180 bajo control de promotores tumorales se comprobó mediante estudios de transactivación del promotor temprano de la gG de PRV a través del plásmido pZGF-SD4 (Muñoz y col., 2010). La actividad de los promotores hTERT y CEA fue analizada indirectamente a través de la producción de IE180 por los plásmidos pATER180 (Piñero, 2009) y pACEA180. La cotransfección de los plásmidos pAZT180, pATER180 y pACEA180 con el plásmido pZGF-SD4 produce la transactivación del promotor de la gG con un incremento en la expresión de la EGFP. Se empleó el plásmido pEGFP-N1 como control positivo de la transfección y el pUC18 como control negativo de fluorescencia.

Para este estudio se cotransfectaron células HeLa Tet-Off. La expresión de la EGFP se detectó por microscopía de fluorescencia (**Figura 18A**). Las células se fijaron a las 24 horas y se valoró la expresión de la EGFP mediante citometría de flujo. Se observó que la expresión de la EGFP bajo el control del promotor inmediatamente temprano de CMV (plásmido pEGFP-N1) es de 9,3 veces, mucho mayor que bajo el control del promotor de la gG (plásmido pZGF-SD4), pero este último aumenta su expresión a 10,8 veces al cotransfectarlo con el plásmido pAZT180, debido a la presencia del transactivador tTA en estas células que permite una gran expresión de la proteína IE180 por el plásmido (**Figura 18B**). La transactivación de la expresión de EGFP por el plásmido pZGF-SD4 es de 5,2 veces en presencia de la IE180 producida bajo el control del promotor tumoral hTERT (plásmido pATER180) y de 6,3 veces bajo el control del promotor tumoral del CEA (plásmido pACEA180) (**Figura 18B**).

La expresión de la EGFP bajo el control del promotor de la gG en las células HeLa Tet-Off es independiente del transactivador controlado por tetraciclina (tTA), ya que la expresión detectada de EGFP fue similar en presencia de doxyciclina (Muñoz y col., 2010).



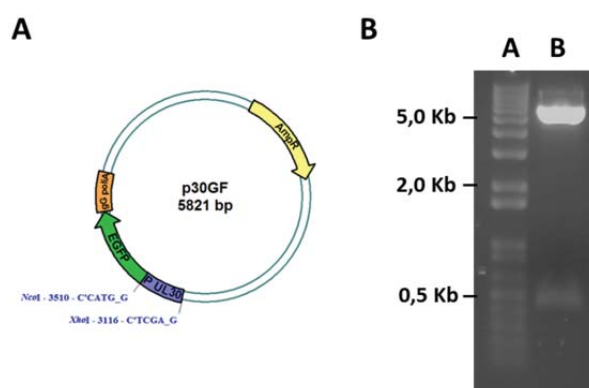
**Figura 18. Análisis de la actividad de los promotores hTERT y CEA.** Cotransfección en HeLa Tet-Off de los plásmidos pAZT180, pATER180 o pACEA180 con el plásmido inducible pZGF-SD4. Los plásmidos pUC18 y pEGFP-N1 se emplearon como control negativo y positivo, respectivamente. **A.** Imágenes de las transfecciones obtenidas por microscopía de fluorescencia 24 horas post-transfección. **B.** Datos de la medición por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia media de las transfecciones a las 24 horas.



### 5.1.3 Efecto de las proteínas IE180 de PRV e ICP4 de HSV-1 sobre la actividad de los promotores tumorales

#### 5.1.3.1 Caracterización de los plásmidos pGEL30 y p30GF

El plásmido p30GF se construyó a partir del pGEL30, como referencia de la expresión de la proteína EGFP bajo el control del promotor temprano del gen UL30 de PRV (**Figura 23**). La caracterización del plásmido pGEL30 se llevó a cabo mediante secuenciación (cebadores DNapol-D y DNapol-R), confirmándose la correcta secuencia del promotor del gen UL30. Además, el plásmido p30GF (5,8 Kb) se caracterizó por digestión enzimática con las enzimas XhoI y NcoI, que originan dos fragmentos, uno de 0,4 Kb, que se corresponde con el promotor UL30, y otro de 5,4 Kb (**Figura 19**).



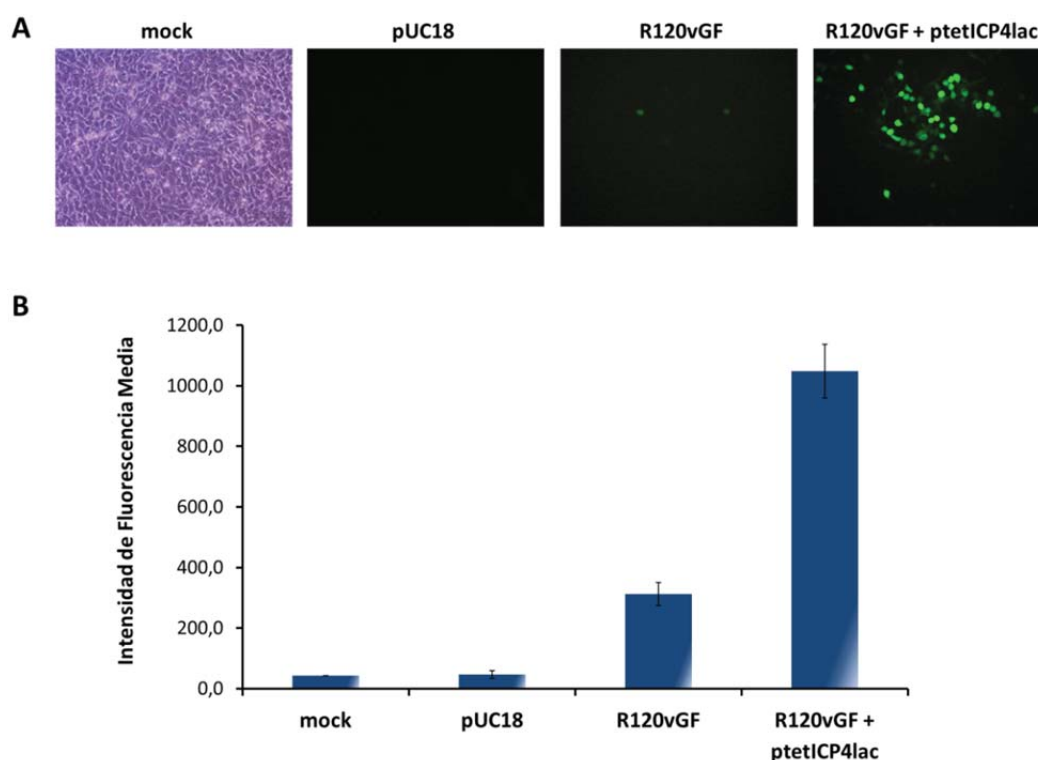
**Figura 19. Caracterización del plásmido p30GF.** A. Mapa de restricción del plásmido p30GF donde se indica la posición de las dianas de restricción NcoI y XhoI, empleadas tanto para su construcción como para su caracterización. B. Marcador de tamaño de DNA 1 Kb Ladder (**carril A**); p30GF digerido con XhoI y NcoI que originan dos fragmentos de 0,4 y 5,4 Kb (**carril B**).

#### 5.1.3.2 Efecto de la IE180 e ICP4 sobre los promotores tumorales

El herpes simplex tipo 1 es un virus bien estudiado y caracterizado debido a su importancia como patógeno humano, al amplio espectro clínico que presenta y, más recientemente, gracias a ser el herpesvirus más empleado en viroterapia. Como se ha comentado en la introducción, la proteína inmediatamente temprana ICP4 de HSV-1 es funcionalmente homóloga a la IE180 de PRV por lo que se decidió incluirla en este

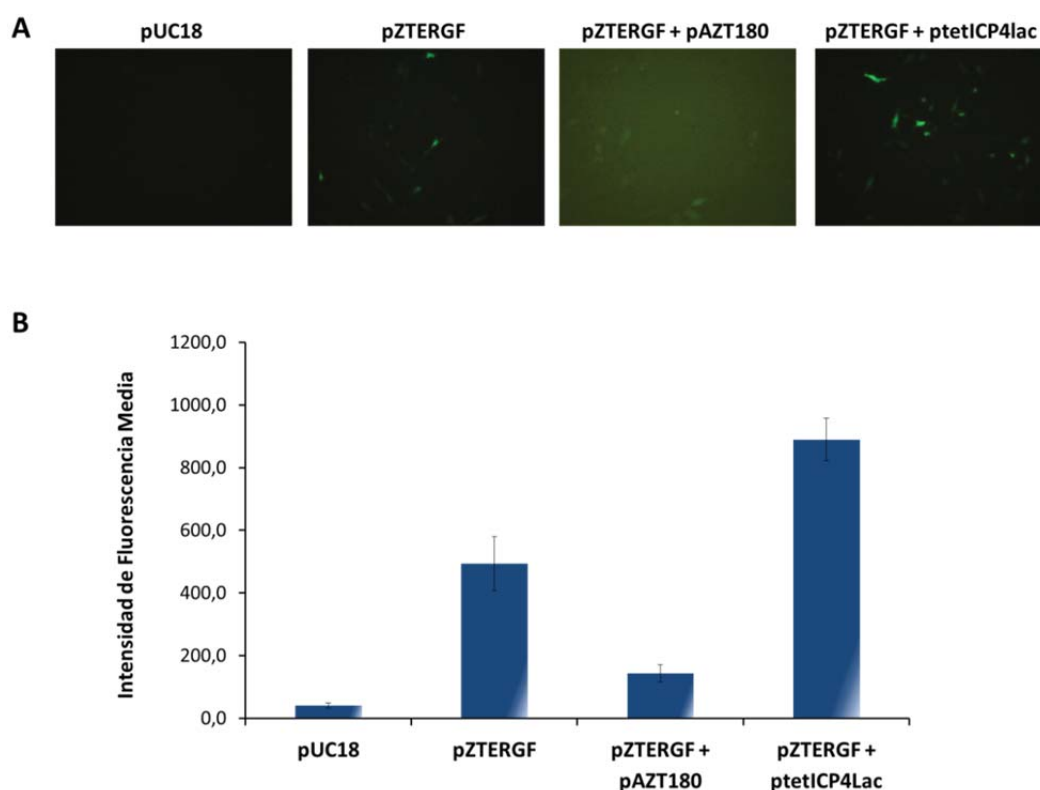
estudio tomándola como referencia y control de los efectos de las proteínas inmediatamente tempranas sobre los promotores tumorales.

Para examinar el papel de las proteínas IE180 de PRV e ICP4 de HSV-1 en la actividad de los promotores tumorales hTERT y CEA obtenidos, se realizaron ensayos con plásmidos que expresan la EGFP bajo el control de los mismos (pZTERGF y pACEA-FG). Estos plásmidos se cotransfectaron con plásmidos que expresan la IE180 (pAZT180) o la ICP4 (ptetICP4lac) bajo el control del promotor inducible por tetraciclina Ptet, el cual produce una alta expresión de proteínas en las células HeLa Tet-Off. La actividad de la proteína ICP4 expresada por el plásmido ptetICP4lac se confirmó mediante la transactivación positiva del virus R120vGF, deficiente en ICP4, analizada por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (**Figura 20**).

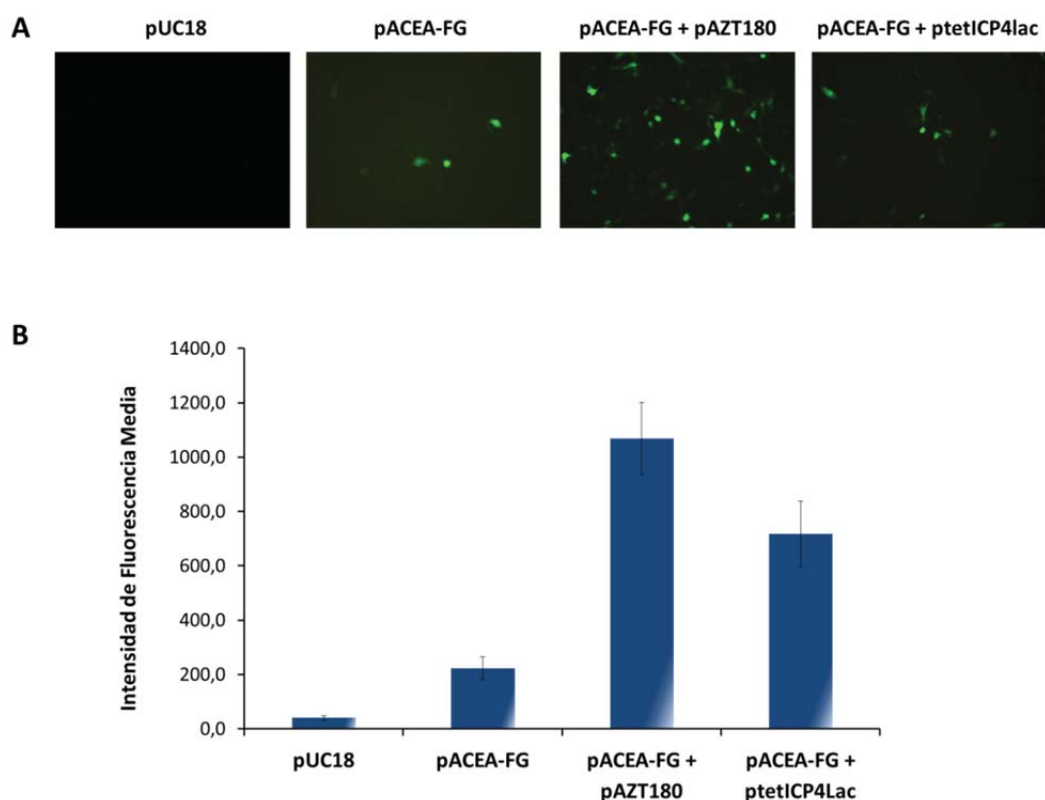


**Figura 20. Análisis de la actividad de la proteína ICP4.** Transfección del plásmido ptetICP4lac con el virus R120vGF en células HeLa Tet-Off. El plásmido pUC18 se empleó como control negativo. **A.** Imágenes de las transfecciones obtenidas por microscopía de fluorescencia 24 horas post-transfección. **B.** Datos de la medición por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia media de las transfecciones a las 24 horas.

Para este estudio se cotransfectaron células HeLa Tet-Off. La expresión de la EGFP se detectó por microscopía de fluorescencia (**Figuras 21A, 22A y 23A**). Las células se fijaron a las 24 horas y se valoró la expresión de la EGFP mediante citometría de flujo. Se observó que la presencia de ICP4 induce la expresión de la EGFP bajo control del promotor tumoral hTERT 2,5 veces (pZTERGF) (**Figura 21B**) y 3,2 veces cuando está bajo el control del promotor tumoral del CEA (pACEA-FG) (**Figura 22B**). Sin embargo, la presencia de la IE180 induce la expresión de la EGFP bajo el control del CEA en 4,8 veces (**Figura 22B**), pero reduce la expresión 3 veces cuando se encuentra bajo el control del promotor hTERT (**Figura 21B**).

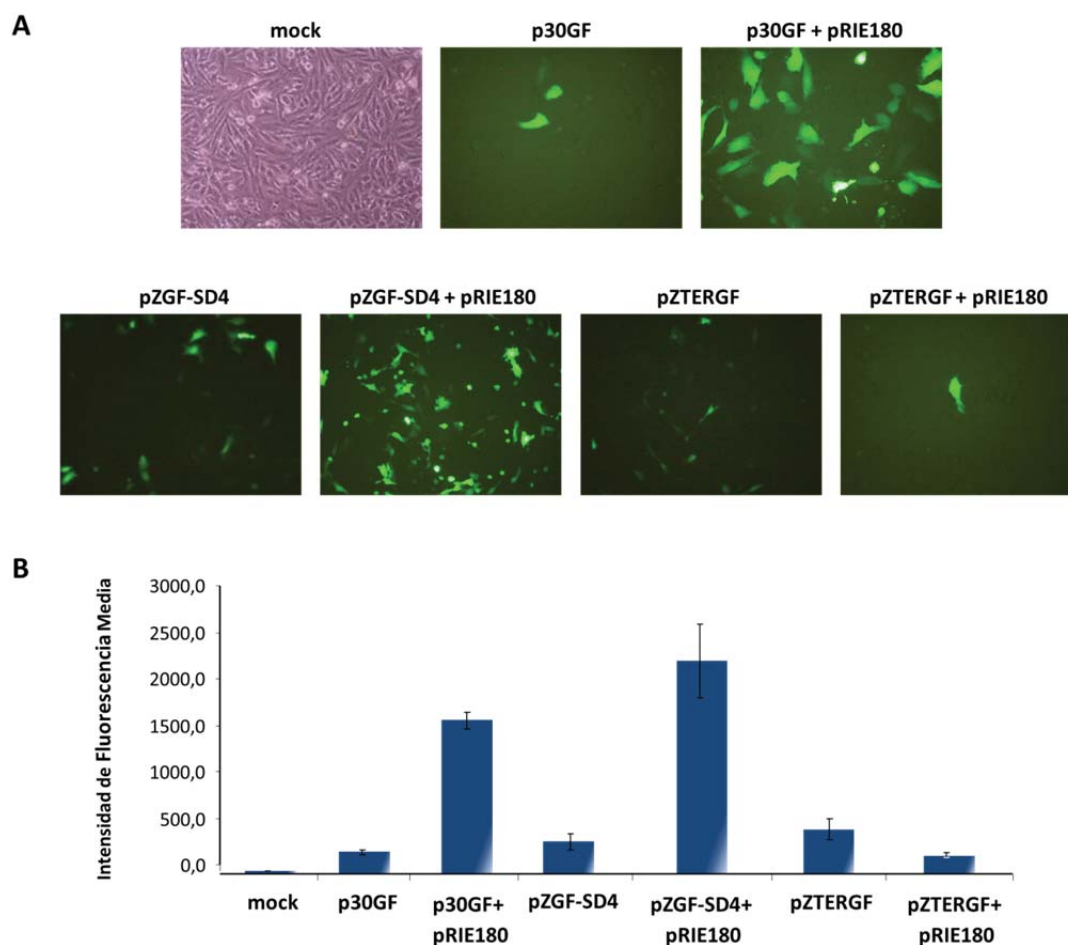


**Figura 21. Efecto de las proteínas IE180 e ICP4 sobre el promotor hTERT.** Estudio de la influencia de las proteínas IE180 de PRV e ICP4 de HSV-1 en la activación del promotor hTERT (pZTERGF). Cotransfección de los plásmidos pAZT180 o ptetICP4lac con el plásmido pZTERGF en células HeLa Tet-Off. El plásmido pUC18 se empleó como control negativo. **A.** Imágenes de las transfecciones obtenidas por microscopía de fluorescencia 24 horas post-transfección. **B.** Datos de la medición por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia media de las transfecciones a las 24 horas.



**Figura 22. Efecto de las proteínas IE180 e ICP4 sobre el promotor CEA.** Estudio de la influencia de las proteínas IE180 de PRV e ICP4 de HSV-1 en la activación del promotor del CEA (pACEA-FG). Cotransfección de los plásmidos pAZT180 o ptetICP4lac con el plásmido pACEA-FG en células HeLa Tet-Off. El plásmido pUC18 se empleó como control negativo. **A.** Imágenes de las transfecciones obtenidas por microscopía de fluorescencia 24 horas post-transfección. **B.** Datos de la medición por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia media de las transfecciones a las 24 horas.

Esta reducción en la expresión, se produce y confirma al cotransfectar con un plásmido que expresa la IE180 bajo su propio promotor (pRIE180) (**Figura 23B**). La presencia de la IE180 expresada por el pRIE180, induce la expresión de la EGFP bajo el control de promotores tempranos como la DNA polimerasa de PRV (plásmido p30GF) en 7,2 veces o el promotor de la gG (pZGF-SD4) en 6,6 veces (**Figura 23B**). Sin embargo, se reduce la expresión de EGFP a 2,4 veces cuando está controlada por el promotor hTERT (**Figura 23B**).



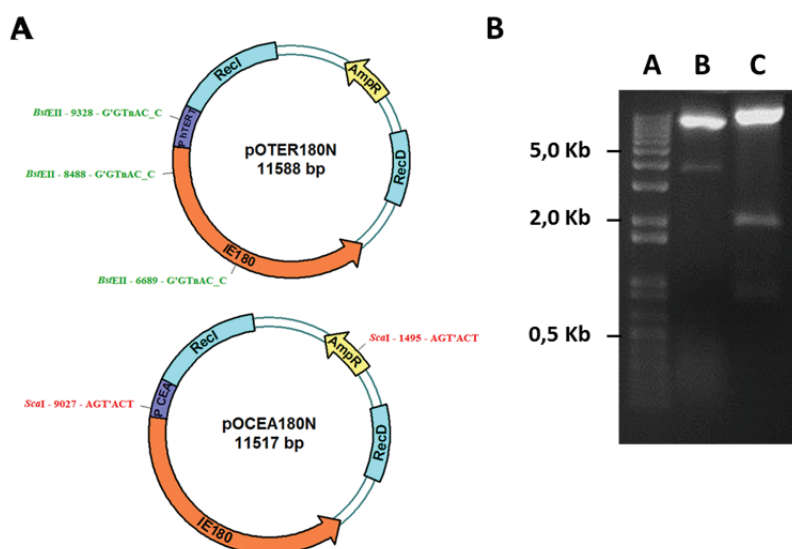
**Figura 23. Análisis comparativo de la actividad de la proteína IE180 sobre el promotor hTERT y promotores tempranos de PRV.** Estudio de la influencia de la proteína IE180 de PRV, expresada bajo el control de su propio promotor (pRIE180), sobre la activación del promotor hTERT (pZTERGF) y de promotores tempranos de PRV (promotor gG, plásmido pZGF-SD4, y promotor de la DNA polimerasa, plásmido p30GF). Cotransfección de los plásmidos p30GF, pZGF-SD4 o pZTERGF con el plásmido pRIE180 en células HeLa Tet-Off. **A.** Imágenes de las transfecciones obtenidas por microscopía de fluorescencia 24 horas post-transfección. **B.** Datos de la medición por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia media de las transfecciones a las 24 horas.

## 5.2 CARACTERIZACIÓN DE VIRUS PRV RECOMBINANTES QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA IE180 BAJO CONTROL DE LOS PROMOTORES TUMORALES hTERT Y CEA

Una vez que se analizó y confirmó el correcto funcionamiento de los promotores tumorales humanos obtenidos, se pasó a la construcción de virus PRV recombinantes cuya proteína IE180 estuviera regulada por los promotores hTERT o del CEA. La estrategia para la obtención de cada uno de los virus oncolíticos consistió, en primer lugar, en construir un plásmido que tuviera las zonas de recombinación homólogas OriS y *pac* flanqueando el casete de expresión formado por la proteína IE180 bajo el control de un promotor tumoral, hTERT o CEA. Una vez obtenidos y caracterizados los plásmidos, se obtuvieron los virus oncolíticos mediante recombinación homóloga con el PBAC90 o con el PBAC80. La recombinación con el PBAC90 hace que los virus resultantes tengan una única copia de la IE180 regulada por el promotor tumoral (PRV-TER y PRV-CEA). Mientras que la recombinación con el PBAC80 hace que los virus resultantes tengan dos copias de la IE180, una regulada por el promotor Ptet y otra por el promotor tumoral (PRV-T180TER y PRV-T180CEA). La presencia en estos virus de la copia de IE180 regulada por el promotor Ptet tiene la intención de favorecer la producción de virus en células HeLa Tet-Off, donde el promotor Ptet se ve estimulado y, por lo tanto, aumenta la expresión de IE180.

### 5.2.1 Caracterización de los plásmidos pOTER180N y pOCEA180N

Para la consecución del objetivo de obtener virus PRV oncolíticos, en primer lugar se construyeron plásmidos que llevaran la construcción de la proteína IE180 bajo control de los promotores tumorales hTERT o CEA. La caracterización de ambos plásmidos se llevó a cabo mediante digestión enzimática (**Figura 24**). Para el plásmido pOTER180N (11,6 Kb) se empleó la enzima BstEII que origina tres fragmentos, de 0,8, 1,8 y 9 Kb. Para el plásmido pOCEA180N (11,5 Kb) se empleó la enzima Scal, que origina dos fragmentos, uno de 4 Kb y otro de 7,5 Kb.



**Figura 24. Caracterización de los plásmidos pOTER180N y pOCEA180N.** **A.** Mapas de restricción de los plásmidos pOTER180N y pOCEA180N, donde se indica la posición de las dianas de restricción BstEII y Scal, empleadas para su caracterización, respectivamente. Se indican, además, las regiones de recombinación homóloga RecI, donde se encuentran las secuencias pac, y RecD, donde se encuentra el oriS. **B.** Marcador de tamaño de DNA 1 Kb Ladder (**carril A**); pOCEA180N digerido con Scal que origina dos fragmentos de 4 y 7,5 Kb (**carril B**); pOTER180N digerido con BstEII que origina tres fragmentos de 0,8, 1,8 y 9 Kb (**carril C**).

## 5.2.2 Análisis del genoma de los virus recombinantes

### 5.2.2.1 Análisis de los virus PRV-TER y PRV-CEA

Los virus descritos en este apartado se obtuvieron mediante recombinación homóloga al cotransfectar fragmentos de los plásmidos anteriormente descritos con el PBAC90. Por lo que estos virus llevan en su genoma una única copia de la proteína IE180, cuya expresión está regulada por un promotor tumoral.

Se realizó un ensayo de PCR para confirmar la inserción del gen de la proteína IE180 regulada por el promotor tumoral en el genoma vírico. Para la caracterización, primero se realizó una extracción del DNA vírico encapsidado a partir de células U2OS infectadas con vBecker2, PRV-TER o PRV-CEA. Además del vBecker2, se empleó el PBAC90 como control en las reacciones. Se amplificó un fragmento específico que incluye parte del promotor de la IE180 y parte de la proteína IE180 (cebadores P180-S y 180-AS, tamaño del amplicón: 1.201 pb), así como un fragmento que incluye parte

del promotor tumoral y parte de la proteína IE180 (cebadores TERT-2D y 180-AS, tamaño del amplicón: 710 pb, para el virus PRV-TER y cebadores CEA-S y 180-AS, tamaño del amplicón: 636 pb, para el virus PRV-CEA). Se amplificó un fragmento del gen de la DNA polimerasa de PRV (cebadores DNAPol-D y DNAPol-R, tamaño del amplicón: 523 pb) como control interno del genoma de los virus. Los fragmentos resultantes se analizaron en un gel de agarosa al 1% y la especificidad de los productos amplificados se confirmó por el tamaño de los mismos. Se observó que el virus PRV-TER presenta la construcción de la IE180 regulada por el promotor de la telomerasa y el virus PRV-CEA la construcción de la IE180 regulada por el promotor del CEA (**Figura 25**). Así mismo, ambos virus y el PBAC90 son negativos para la proteína IE180 regulada bajo su propio promotor (**Figura 25**). El fragmento de la DNA polimerasa se amplifica en los tres virus y en el PBAC90 (**Figura 25**).



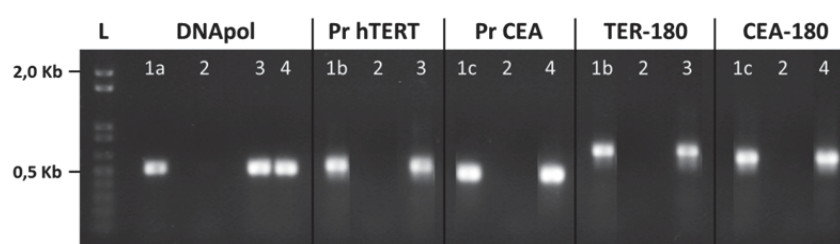
**Figura 25. Caracterización de los virus PRV-TER y PRV-CEA.** Reacción de PCR a partir del PBAC90 y del DNA de los virus vBecker2, PRV-TER y PRV-CEA, en la que se amplificaron los genes de la DNA polimerasa (**DNAPol**, tamaño del amplicón: 523 pb) e IE180 de PRV (tamaño del amplicón: 1.201 pb), así como fragmentos que incluyen parte del promotor tumoral y parte de la IE180 (**TER-180**, tamaño del amplicón: 710 pb, y **CEA-180**, tamaño del amplicón: 636 pb). vBecker2 (**1**); PBAC90 (**2**); PRV-TER (**3**); PRV-CEA (**4**); control negativo de la reacción (**5**); marcador de tamaño de DNA 1 Kb Ladder (**L**).

#### 5.2.2.2 Análisis de los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA

Los virus descritos en este apartado, se obtuvieron mediante recombinación homóloga al cotransfectar fragmentos de los plásmidos anteriormente descritos con el PBAC80. Por lo que estos virus llevan en su genoma dos copias de la proteína IE180, una de ellas se encuentra bajo el control del promotor inducible Ptet y la otra bajo el control de un promotor tumoral.



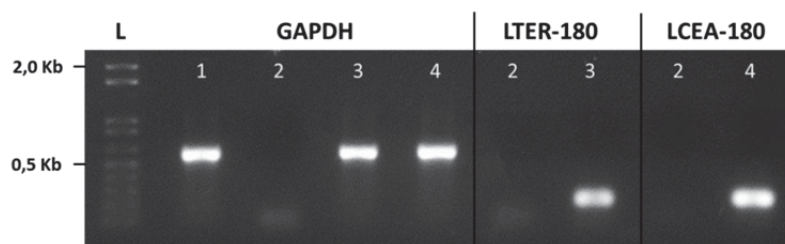
Se realizó un ensayo de PCR para confirmar la inserción del gen de la proteína IE180 regulada por el promotor tumoral en el genoma vírico. Para la caracterización, primero se realizó una extracción del DNA vírico encapsidado a partir de células HeLa Tet-Off infectadas con PRV-T180TER o PRV-T180CEA. Además, se emplearon el PBAC80, pOTER180N y pOCEA180N como controles positivos de las reacciones. Se amplificaron fragmentos específicos del promotor hTERT (cebadores TERT-2D y TERT-2R, tamaño del amplicón: 553 pb), del CEA (cebadores CEA-S y CEA-AS, tamaño del amplicón: 482 pb) y un fragmento que incluye parte del promotor tumoral y parte de la proteína IE180 (cebadores TERT-2D y 180-AS, tamaño del amplicón: 710 pb, para el promotor hTERT y cebadores CEA-S y 180-AS, tamaño del amplicón: 636 pb para el promotor del CEA). Se empleó un fragmento del gen de la DNA polimerasa de PRV (cebadores DNAPol-D y DNAPol-R, tamaño del amplicón: 523 pb) como control interno del genoma de los virus. Los fragmentos resultantes se analizaron en un gel de agarosa al 1% y la especificidad de los productos amplificados se confirmó por el tamaño de los mismos. Se observó que el virus PRV-T180TER presenta tanto el promotor de la telomerasa como la construcción de la IE180 regulada por el promotor de la telomerasa (**Figura 26**). Al igual que el virus PRV-T180CEA, que presenta el promotor del CEA y la construcción de la IE180 regulada por el promotor del CEA (**Figura 26**). El fragmento de la DNA polimerasa se amplifica en los dos virus y en el PBAC80 (**Figura 26**).



**Figura 26. Caracterización de los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA por PCR.** Reacción de PCR a partir del PBAC80 y del DNA de los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA, en la que se amplificó el gen de la DNA polimerasa de PRV (**DNAPol**, tamaño del amplicón: 523 pb), el promotor hTERT (**Pr hTERT**, tamaño del amplicón: 553 pb), el promotor del CEA (**Pr CEA**, tamaño del amplicón: 482 pb) y fragmentos que incluyen parte del promotor tumoral y parte de la IE180 (**TER-180**, tamaño del amplicón: 710 pb, y **CEA-180**, tamaño del amplicón: 636 pb). Control positivo PBAC80 (**1a**); control positivo pOTER180N (**1b**); control positivo pOCEA180N (**1c**); control negativo de la reacción (**2**); PRV-T180TER (**3**); PRV-T180CEA (**4**); marcador de tamaño de DNA 1 Kb Ladder (**L**).

### 5.2.3 Expresión del gen IE180 por los virus recombinantes PRV-T180TER y PRV-T180CEA

Debido a la presencia de dos copias de la proteína IE180 reguladas bajo el control de dos promotores distintos (promotor inducible Ptet y promotor tumoral), los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA se caracterizaron, además, mediante RT-PCR, con el fin de confirmar la expresión de la IE180 bajo los promotores tumorales. Para ello, se diseñaron unos cebadores que amplifican en la secuencia líder (5'UTR) de los mRNA que se transcriben a partir de la construcción de la proteína IE180 regulada bajo los promotores tumorales. Se seleccionaron las células U2OS con la intención de favorecer la expresión de la IE180 por los promotores tumorales. Para la caracterización por RT-PCR, se realizó una extracción de RNA a partir de células U2OS sin infectar e infectadas con PRV-T180TER o PRV-T180CEA. Para el análisis del virus PRV-T180TER, se empleó la pareja de cebadores L-hTERT y 180-AS (tamaño del amplicón: 207 pb). En el análisis del virus PRV-T180CEA, se empleó la pareja de cebadores L-CEA y 180-AS (tamaño del amplicón: 208 pb). Como control interno de la reacción se empleó el gen celular GAPDH (cebadores GAPDH-S y GAPDH-AS, tamaño del amplicón: 587 pb). Los fragmentos resultantes se analizaron en un gel de agarosa al 1% y la especificidad de los productos amplificados se confirmó por el tamaño de los mismos. Se observó que el virus PRV-T180TER presenta tanto el promotor de la telomerasa como la construcción de la IE180 regulada por el promotor de la telomerasa (**Figura 27**). Al igual que el virus PRV-T180CEA, que presenta el promotor del CEA y la construcción de la IE180 regulada por el promotor del CEA (**Figura 27**). El fragmento de la DNA polimerasa se amplifica en los dos virus y en el PBAC80 (**Figura 27**).



**Figura 27. Caracterización de los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA por RT-PCR.** Reacción de RT-PCR a partir del RNA de células U2OS infectadas con los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA. Se amplificaron los fragmentos que incluyen parte de la secuencia líder de los promotores tumorales y parte de la IE180 (**LTER-180**, tamaño del amplicón: 207 pb, y **LCEA-180**, tamaño del amplicón: 208 pb); el gen GAPDH se empleó como control de la reacción (tamaño del amplicón: 587 pb). U2OS control (**1**); control negativo de la reacción (**2**); PRV-T180TER (**3**); PRV-T180CEA (**4**); marcador de tamaño de DNA 1 Kb Ladder (**L**).

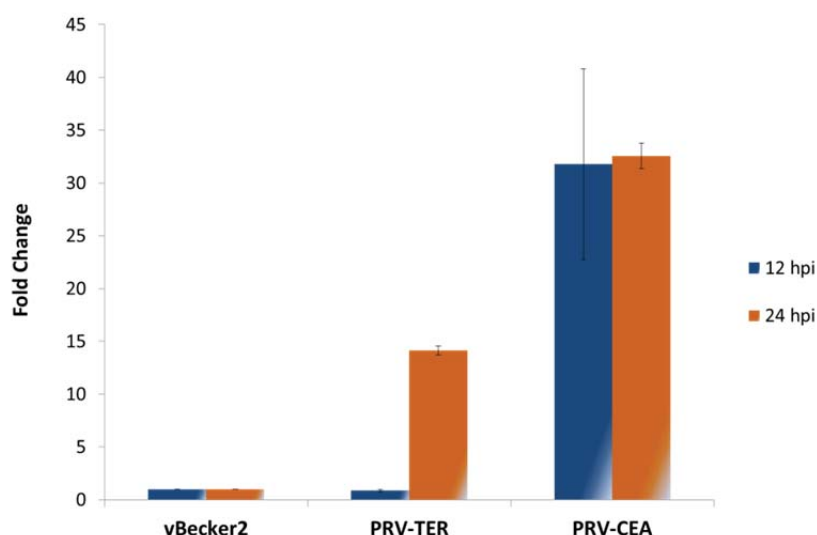
### 5.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN IE180 EN LOS VIRUS RECOMBINANTES PRV-TER Y PRV-CEA Y DE SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN APOPTOSIS

#### 5.3.1 Expresión del gen IE180 bajo control de promotores tumorales en los virus recombinantes PRV-TER y PRV-CEA

Tras la obtención de los virus recombinantes, se realizó un ensayo para estudiar el funcionamiento de los promotores tumorales dentro del contexto del genoma vírico y poder así compararlo con los resultados obtenidos en el apartado 5.1, en el que se realizaba el análisis funcional de los promotores. En este estudio se midieron, mediante qPCR, los niveles de expresión de los mRNAs de la proteína IE180 producidos por los virus recombinantes PRV-TER y PRV-CEA en comparación con su virus parental vBecker2.

Para ello, se analizó el RNA de células U2OS infectadas con los virus vBecker2, PRV-TER y PRV-CEA a 12 y a 24 horas post-infección (hpi) a una MOI de 0,1. Tras la retrotranscripción del RNA, se llevó a cabo la reacción de qPCR, en la que se emplearon las parejas de cebadores q180-S y q180-AS (tamaño del amplicón: 122 pb). Como gen de normalización de la reacción se empleó el gen celular de la  $\beta$ -actina (cebadores Hu $\beta$ -actin For y Hu $\beta$ -actin Rev, tamaño del amplicón: 125 pb). Los datos obtenidos para el virus vBecker2 se emplearon en el análisis para normalizar los datos

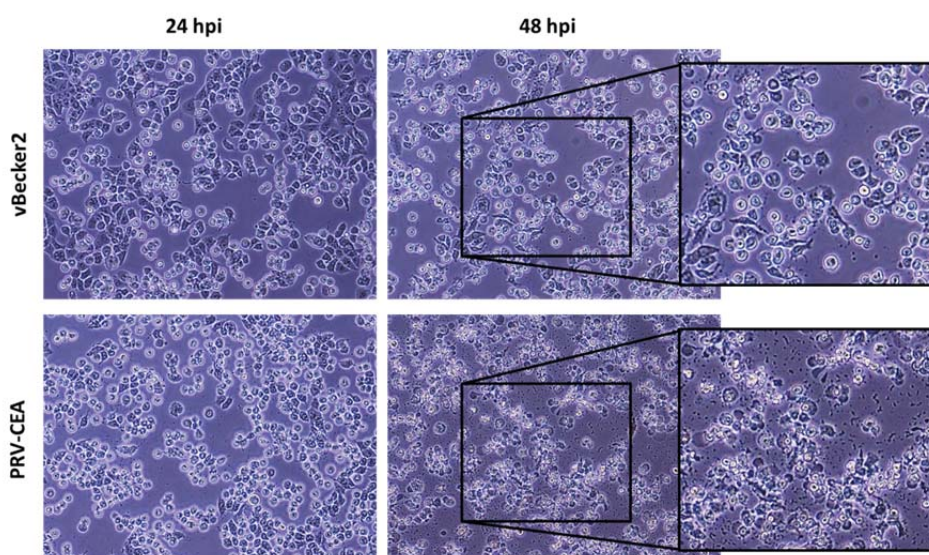
de los virus PRV-TER y PRV-CEA. Se observó que, en comparación con el virus vBecker2, los niveles de expresión de la proteína IE180 por el virus PRV-TER se reducen ligeramente a las 12 hpi, mientras que aumentan 14 veces a las 24 hpi (**Figura 28**). Para el virus PRV-CEA se observa que, en comparación con el virus vBecker2, los niveles de expresión de la IE180 aumentan 32 veces tanto a las 12 como a las 24 hpi (**Figura 28**).



**Figura 28. Análisis de la expresión de los mRNAs de la proteína IE180 bajo control de los promotores tumorales en los virus PRV-TER y PRV-CEA.** Análisis de qPCR del mensajero de la IE180 a partir del RNA total extraído de células U2OS infectadas a MOI 0,1 con los virus vBecker2, PRV-TER y PRV-CEA. Analizado a las 12 horas post-infección (hpi) y a las 24 hpi. Niveles normalizados con la expresión del gen celular de la  $\beta$ -actina. Los niveles de expresión de IE180 de vBecker2 se han normalizado a 1.0 para el análisis comparativo con los niveles de PRV-TER y PRV-CEA.

### 5.3.2 Inducción de apoptosis por el virus PRV-CEA

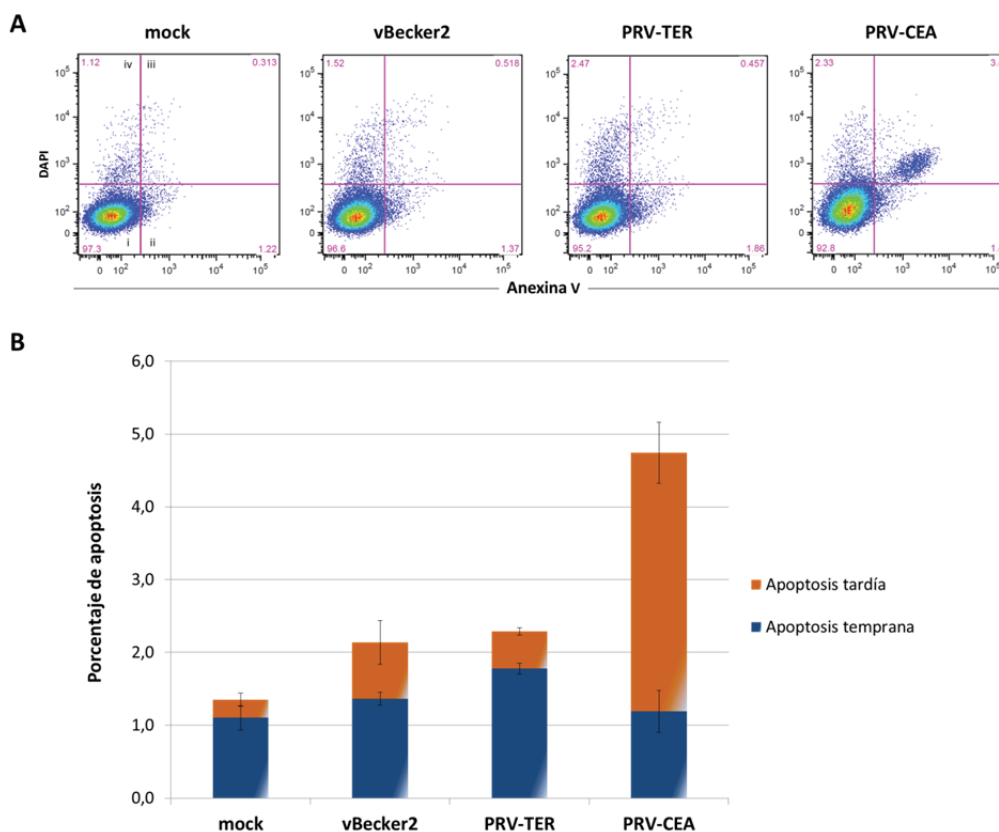
Durante el análisis de los virus recombinantes, se observó que las células U2OS infectadas con el virus PRV-CEA mostraban un efecto citopático más severo que el causado por el virus parental vBecker2, caracterizado principalmente por el redondeamiento de las células y su desprendimiento progresivo del soporte. Para poder caracterizar el efecto citopático producido por el PRV-CEA se infectaron monocapas subconfluentes de células U2OS con los virus vBecker2 y PRV-CEA a MOI 0,1 y se visualizaron por microscopía óptica a tiempos 24 y 48 hpi.



**Figura 29. Comparativa del efecto citopático entre los virus vBecker2 y PRV-CEA.** Imágenes de células U2OS infectadas por 24 y 48 horas con los virus vBecker2 y PRV-CEA (MOI 0,1) obtenidas por microscopía óptica. Se observa el efecto citopático diferencial causado por ambos virus.

En la figura 29 puede apreciarse el progreso de la infección en ambos virus. Comparada a las células infectadas con vBecker2, la morfología presentada por las células U2OS infectadas por el PRV-CEA muestra, tras 48 hpi, similitudes con la observada en casos de apoptosis, como la reducción del volumen o la alteración de la membrana plasmática en la que aparecen protuberancias (Taylor y col., 2008). Además, una inducción de apoptosis por PRV-CEA puede ser posible por el hecho de que este virus expresa unos altos niveles de la proteína IE180, en comparación con el virus parental vBecker2, puede estar relacionado con el incremento de células neuronales apoptóticas, como se vio en las células neuronales del cerebelo de ratones transgénicos que expresan la IE180 (Tomioka y col., 2008). Por ello, se decidió realizar un análisis para poder determinar si el virus PRV-CEA inducía apoptosis en las células U2OS infectadas, comparándolo con el virus parental vBecker2 y el recombinante PRV-TER.

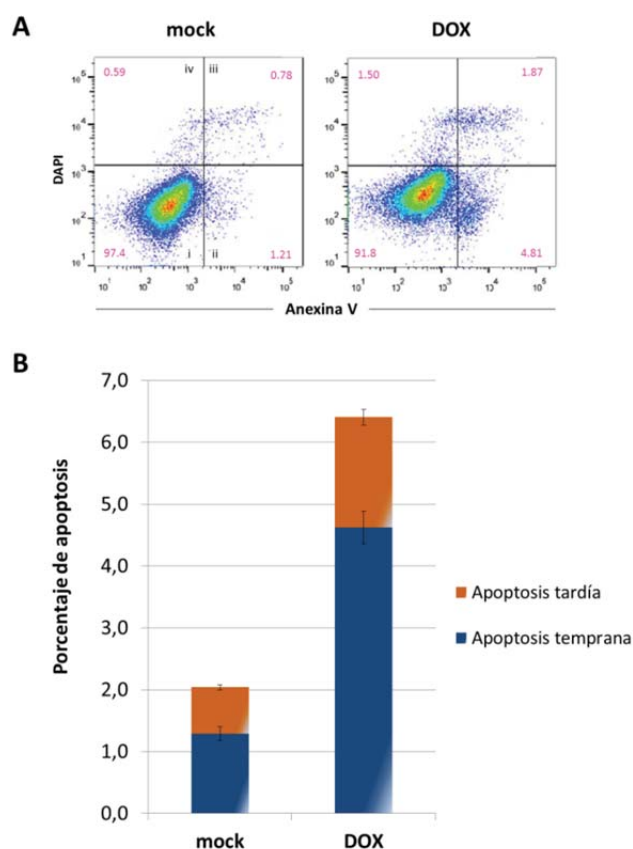
Para conseguir este objetivo, se realizó un ensayo de marcaje celular con anexina V. Se infectaron monocapas subconfluentes de células U2OS con los virus vBecker2, PRV-TER y PRV-CEA a MOI 0,2. A las 24 hpi se recogieron y marcaron las células con anexina V (conjugada con APC) y DAPI. Seguidamente, se procedió a su análisis mediante citometría de flujo. Los datos recogidos se analizaron con el programa FlowJo (**Figura 30A**). Se observó que los niveles de apoptosis total (temprana más tardía) son similares entre los virus vBecker2 y PRV-TER, siendo un poco menor la apoptosis temprana y mayor la apoptosis tardía en el vBecker2 que en el PRV-TER (**Figura 30B**). Sin embargo, en el PRV-CEA los niveles de apoptosis temprana son ligeramente inferiores, mientras que los de apoptosis tardía aumentan 4,6 veces respecto al vBecker2 (3,47% con PRV-CEA frente al 0,52% con vBecker2) (**Figura 30A**).



**Figura 30. Análisis de la inducción de apoptosis por los virus vBecker2, PRV-TER y PRV-CEA.** Ensayo de cuantificación de apoptosis en células U2OS infectadas a MOI 0,1 con los virus vBecker2, PRV-TER o PRV-CEA, analizado por citometría de flujo y tinción con Anexina V/DAPI. **A.** Dot plot que representa el porcentaje de células vivas (i), células positivas para apoptosis temprana (ii), células positivas para apoptosis tardía (iii) y células muertas (iv). **B.** Representación de la media de los datos obtenidos para apoptosis temprana y apoptosis tardía.



Esta capacidad de la proteína IE180 para inducir apoptosis se confirmó en las células PK15-IE180, que expresan de manera estable la IE180 bajo el control del promotor inducible por tetraciclina (Ptet) (Oyibo y col., 2014). Para ello se incubaron las células PK15-IE180 en presencia de doxiciclina y se recogieron y marcaron con anexina V tras 48 horas post-inducción. Los datos recogidos mediante citometría de flujo se analizaron con el programa FlowJo (**Figura 31A**). Se observó que en presencia de doxiciclina la expresión de IE180 induce tanto la apoptosis temprana como la tardía al compararlo con las células no tratadas (**Figura 31B**). Los niveles de apoptosis temprana aumentan 3,6 veces, al obtenerse valores de 4,81% con inducción frente al 1,21% control (**Figura 31A**) y los de apoptosis tardía 2,4 veces respecto a las células control (1,87% con inducción frente al 0,78% control) (**Figura 31A**).



**Figura 31. Análisis de la inducción de apoptosis por la IE180 en células PK15-IE180.** Ensayo de cuantificación de apoptosis en células PK15-IE180 incubadas en presencia de doxiciclina (DOX), analizado por citometría de flujo y tinción con Anexina V/DAPI. **A.** Dot plot que representa el porcentaje de células vivas (i), células positivas para apoptosis temprana (ii), células positivas para apoptosis tardía (iii) y células muertas (iv). **B.** Representación de la media de los datos obtenidos para apoptosis temprana y apoptosis tardía.

## **5.4 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS VIRUS RECOMBINANTES**

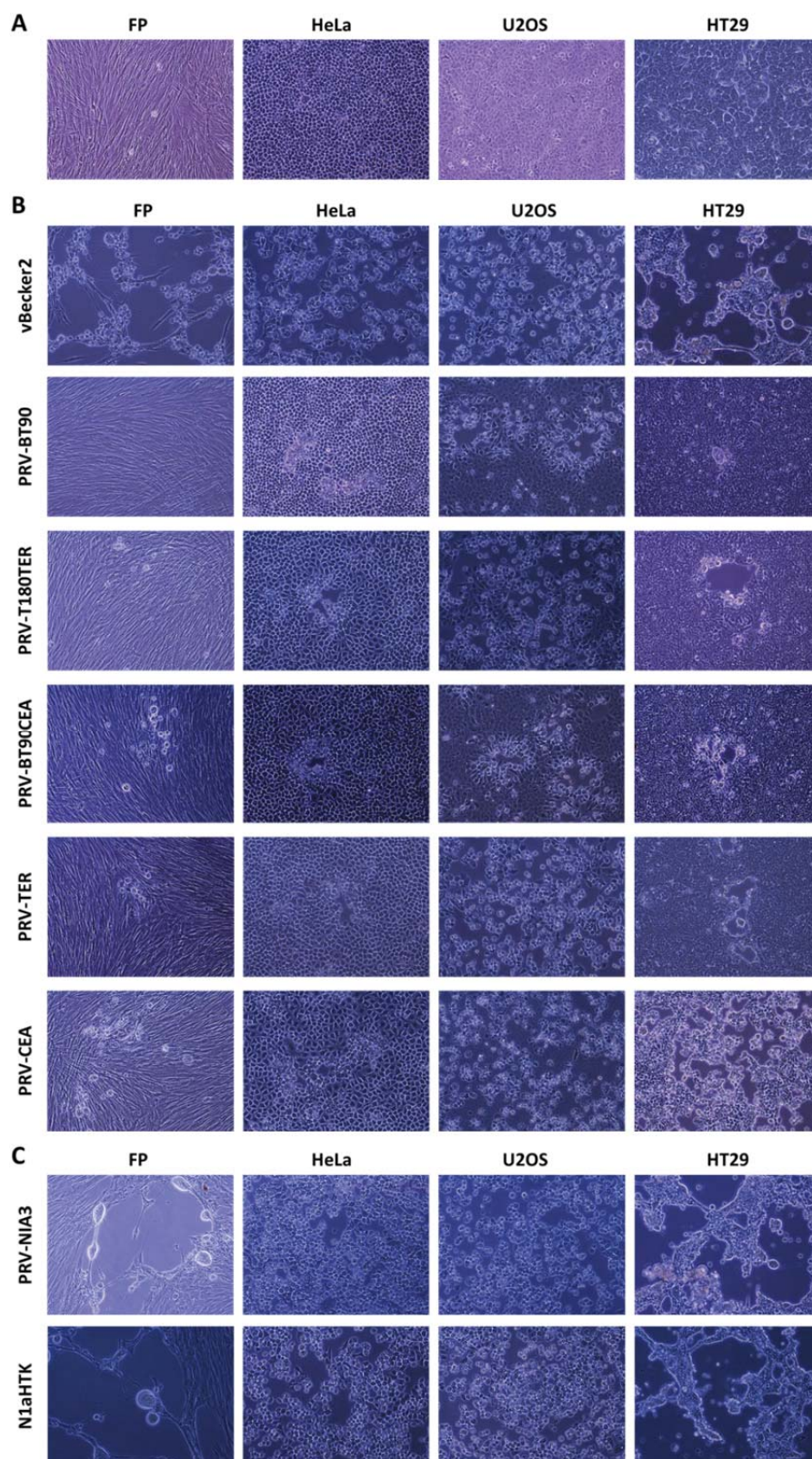
Una vez obtenidos y caracterizados los virus con potencial oncolítico, se pasó a estudiar su crecimiento en diferentes líneas tumorales. Para ello, se dispuso de un grupo de líneas celulares establecidas representativas de distintos tipos de tumores y un grupo de células primarias de cáncer de páncreas.

### **5.4.1 Crecimiento vírico en líneas celulares tumorales**

Para comenzar con el estudio de los virus, se seleccionaron las líneas de cultivo de células cancerígenas humanas HeLa (cáncer de cuello de útero), HT29 (cáncer de colon) y U2OS (osteosarcoma). Como células control no tumorales, se seleccionaron las FP7 (fibroblastos de pulmón humano).

Para analizar los niveles de producción de los cuatro virus recombinantes obtenidos, se realizó un análisis del crecimiento en distintas líneas tumorales, en el que se empleó como control el virus vBecker2, generado al transfectar el BAC pBecker2 que contiene todo el genoma de la cepa virulenta PRV-Becker (Smith y Enquist, 2000) y que ha sido usado como BAC parental para la generación de los cuatro virus recombinantes de este estudio. El virus PRV-BT90, se ha empleado como referencia de los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA, al expresar una única copia de la proteína IE180 controlada por el promotor inducible por tetraciclina. Además, se ha incluido en este ensayo el virus recombinante N1aHTK, que posee el gen de la TK de HSV-1 (Gómez-Sebastián y Tabarés, 2004), para el que se ha empleado el virus PRV-NIA3 como referencia. Para ello, se infectaron monocapas subconfluentes de células FP7, HeLa, U2OS y HT29 con los virus a MOI 0,1. A las 48 horas se recogieron las infecciones y se titularon en células U2OS.



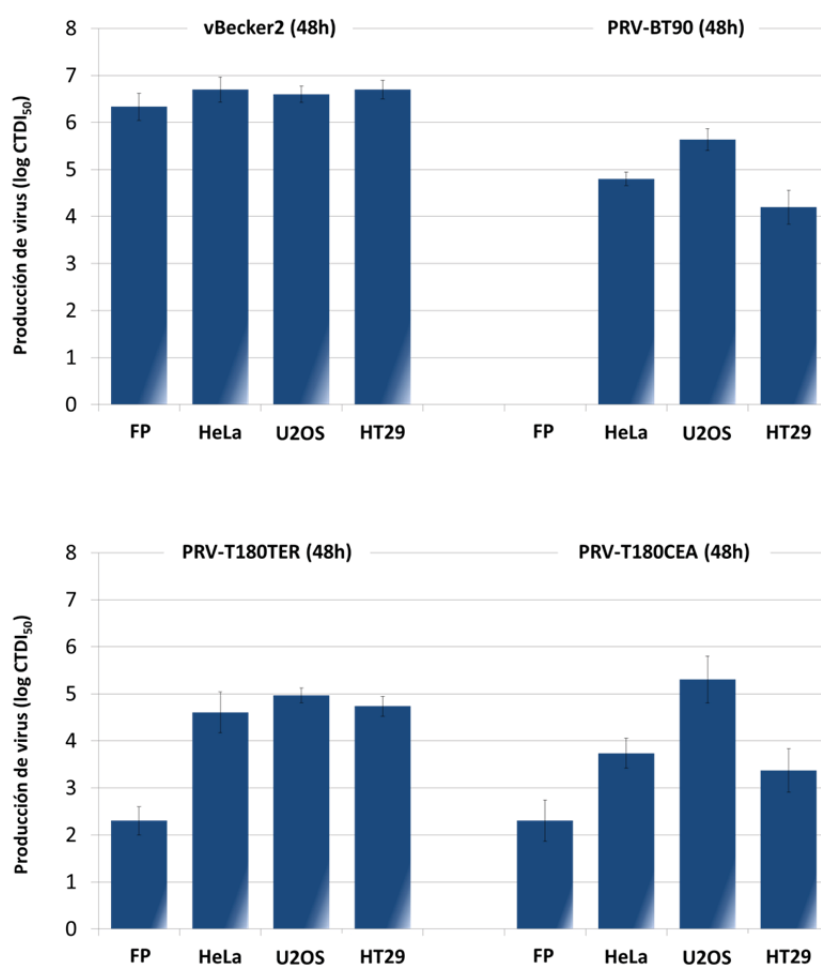


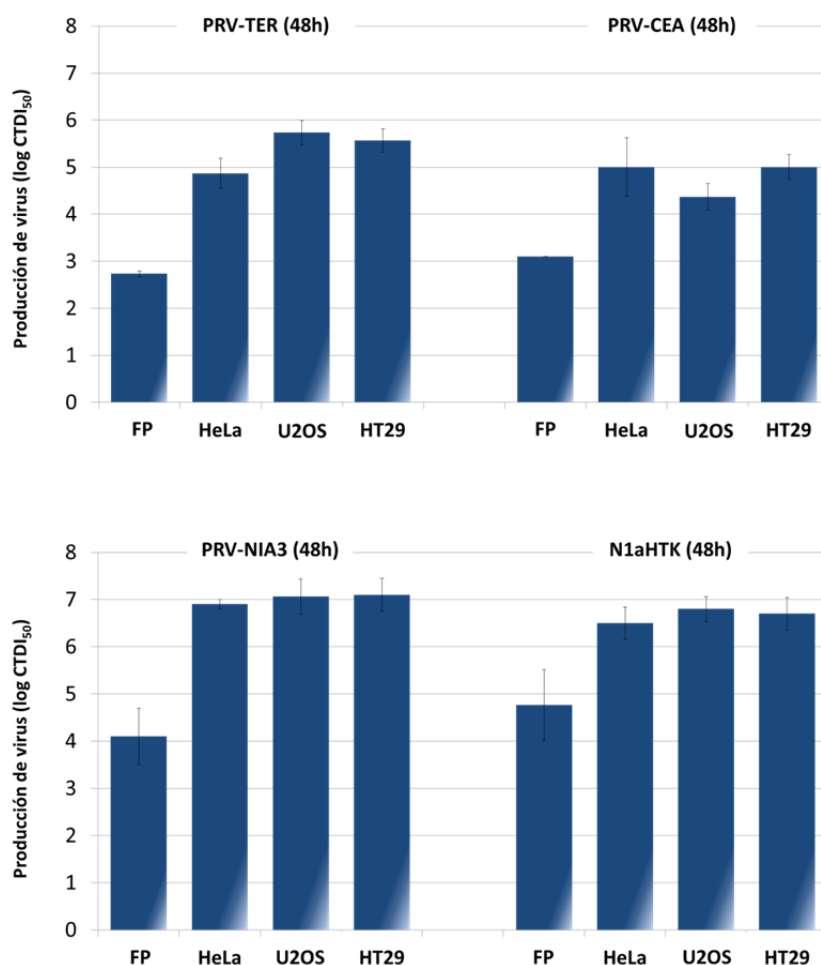
**Figura 32. Imágenes de los ensayos de producción de virus.** Análisis mediante microscopía óptica del crecimiento de los virus recombinantes (MOI 0,1) en las líneas celulares FP7, HeLa, U2OS y HT29. **A.** Imágenes de las células sin infectar obtenidas por microscopía óptica. **B.** Imágenes de las células infectadas con los virus vBecker2, PRV-BT90, PRV-T180TER, PRV-T180CEA, PRV-TER y PRV-CEA obtenidas por microscopía óptica. **C.** Imágenes de las células infectadas con los virus PRV-NIA3 y N1aHTK.

Se observó que hay diferencias de crecimiento entre los virus parentales y entre los virus recombinantes dependiendo del tipo celular (**Figuras 32 y 33**):

- **vBecker2 y PRV-BT90.** La más notable se da en las células FP7, donde el virus vBecker2 tiene un título de crecimiento de 6,3 logaritmos (logs) mientras que el virus PRV-BT90 no es capaz de replicar. En el resto de las células, se producen mayores títulos en el vBecker2, siendo la diferencia de 1,9 logs en HeLa, 1 en U2OS y 2,5 en HT29.
  - **vBecker2 y PRV-T180TER.** vBecker2 tiene mayores títulos de crecimiento. La diferencia más notable se vuelve a dar en células FP7, donde vBecker2 tiene un título de crecimiento de 4 logs por encima de PRV-T180TER. En el resto de células, la diferencia es de 2,1 logs en HeLa, 1,6 en U2OS y 2 en HT29.
  - **vBecker2 y PRV-T180CEA.** vBecker2 tiene mayores títulos de crecimiento. La mayor diferencia es, igualmente, en células FP7, donde vBecker2 tiene un título de crecimiento de 4 logs por encima de PRV-T180CEA. En el resto de células, la diferencia es de 3 logs en HeLa, 1,3 en U2OS y 3,3 en HT29.
- PRV-BT90 y PRV-T180TER.** PRV-BT90 no crece en células FP7, mientras que PRV-T180TER tiene un título de 2,3 logs. En el resto de células, las diferencias son mínimas, no superando los 0,6 logs.
- **PRV-BT90 y PRV-T180CEA.** PRV-BT90 no crece en células FP7, mientras que PRV-T180CEA tiene un título de 2,3 logs. En U2OS prácticamente no hay diferencia y en HeLa y HT29 PRV-BT90 tiene un título un logaritmo mayor que PRV-T180CEA.
  - **vBecker2 y PRV-TER.** vBecker2 tiene mayores títulos de crecimiento. Se observó una baja capacidad de infección de PRV-TER en células FP7, siendo el título de vBecker2 3,6 logs mayor. En células HeLa, vBecker2 tiene un título 1,8 logs mayor a PRV-TER, mientras que en U2OS y HT29 la diferencia es de un logaritmo.

- **vBecker2 y PRV-CEA.** vBecker2 tiene mayores títulos de crecimiento. Se observó una baja capacidad de infección de PRV-CEA en células FP7, siendo el título de vBecker2 3,2 logs mayor. En células HeLa y HT29 la diferencia es de 1,5 logs, y en U2OS de 2 logs.
- **PRV-NIA3 y vBecker2.** Entre los dos virus parentales las diferencias de crecimiento obtenidas son mínimas en células HeLa, U2OS y HT29. Mientras que en células FP7 se observa un crecimiento de vBecker2 de 2,2 logs mayor que PRV-NIA3.
- **PRV-NIA3 y N1aHTK.** Los datos de crecimiento entre ambos virus son muy similares en todas las líneas celulares.





**Figura 33. Análisis de los ensayos de producción de virus en células tumorales.** Estudio del crecimiento de los virus recombinantes en las líneas celulares FP7, HeLa, U2OS y HT29 tras 48 horas de infección y a MOI 0,1.

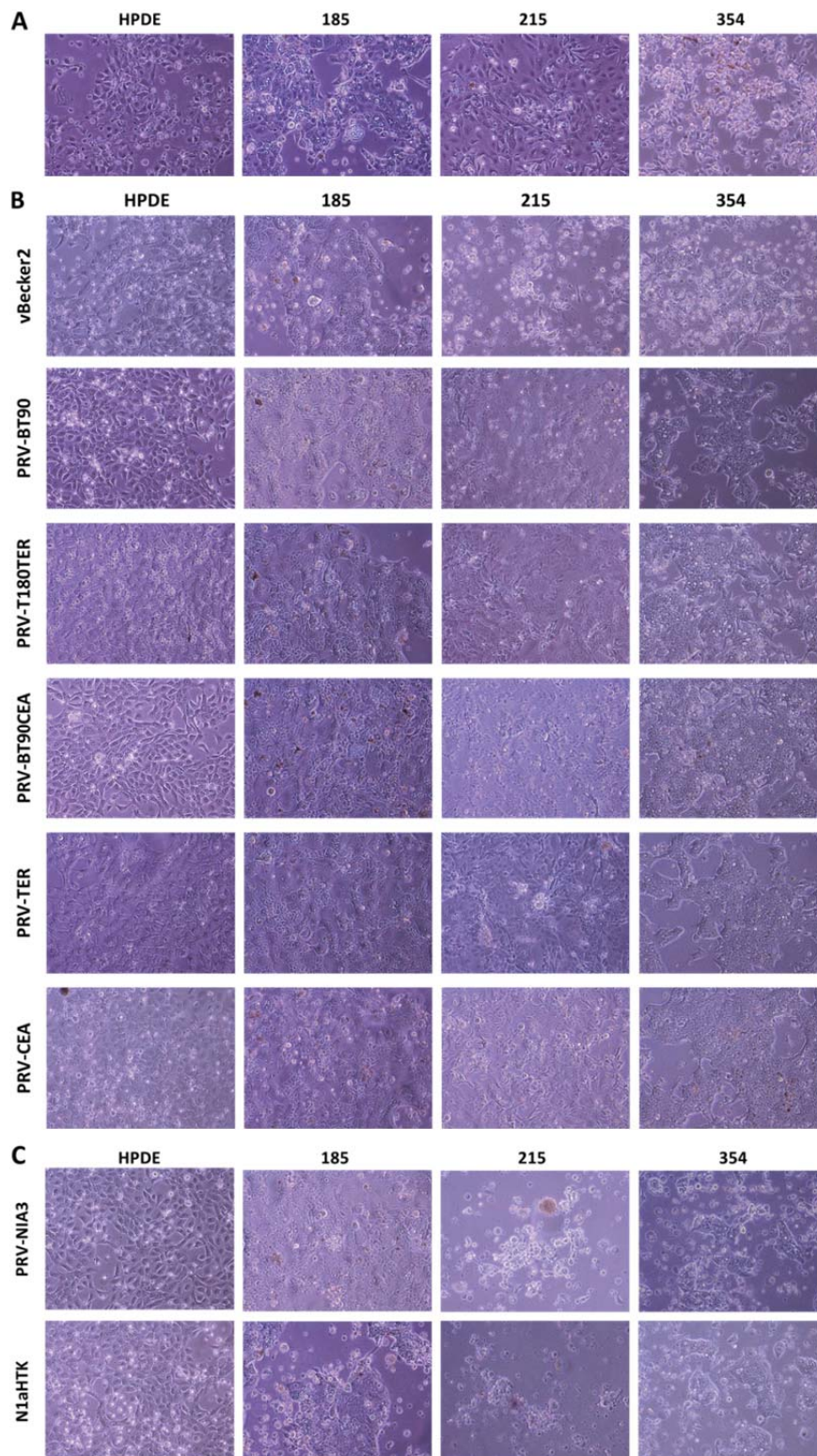
Respecto a las propiedades citolíticas de los virus recombinantes obtenidos, observamos que en las células FP7, no tumorales, todos crecen con un título inferior a 3 logs. En las líneas celulares tumorales, los que muestran un mayor título y una mayor homogeneidad de infección en las tres líneas, son los virus PRV-TER y PRV-CEA. Además, cabe destacar la ausencia de replicación del virus PRV-BT90 en células no tumorales, mientras que sí replica en las células tumorales.

#### **5.4.2 Crecimiento vírico en células primarias de cáncer de páncreas**

Una vez analizadas las propiedades citolíticas de los virus en líneas celulares establecidas, se pasó a su estudio en líneas primarias de cáncer de páncreas. Se emplearon las líneas 185, 215 y 354, derivadas de pacientes con cáncer de páncreas. Como células control no tumorales, se seleccionaron las células HPDE, células humanas primarias de origen ductal epitelial.

Al igual que en el apartado 5.4.2, se realizó un análisis del crecimiento de los virus recombinantes obtenidos en líneas primarias de cáncer de páncreas. Igualmente, se empleó el virus vBecker2 como referencia y el PRV-BT90 como referencia para los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA. También se incluyeron en el ensayo los virus N1aHTK y el PRV-NIA3. Para ello, se infectaron monocapas subconfluentes de células HPDE, 185, 215, y 354, con los virus a MOI 0,1. A las 72 horas se recogieron las infecciones y se titularon en células U2OS.



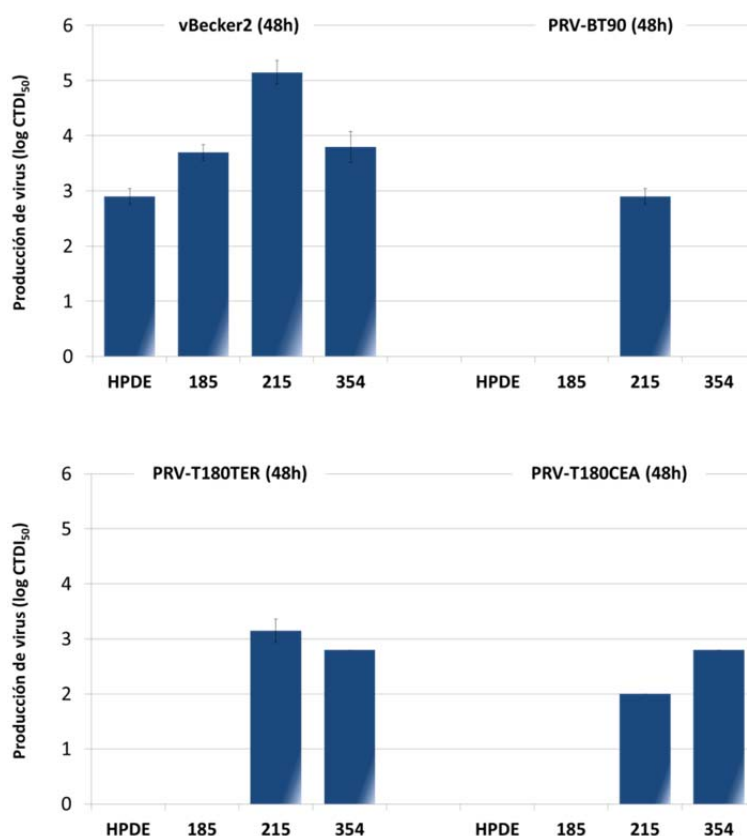


**Figura 34. Imágenes de los ensayos de producción de virus en líneas primarias de cáncer de páncreas.** Análisis mediante microscopía óptica del crecimiento de los virus recombinantes (MOI 0,1) en las líneas celulares HPDE, 185, 215 y 354. **A.** Imágenes de las células sin infectar obtenidas por microscopía óptica. **B.** Imágenes de las células infectadas con los virus vBecker2, PRV-BT90, PRV-T180TER, PRV-T180CEA, PRV-TER y PRV-CEA obtenidas por microscopía óptica. **C.** Imágenes de las células infectadas con los virus PRV-NIA3 y N1aHTK.

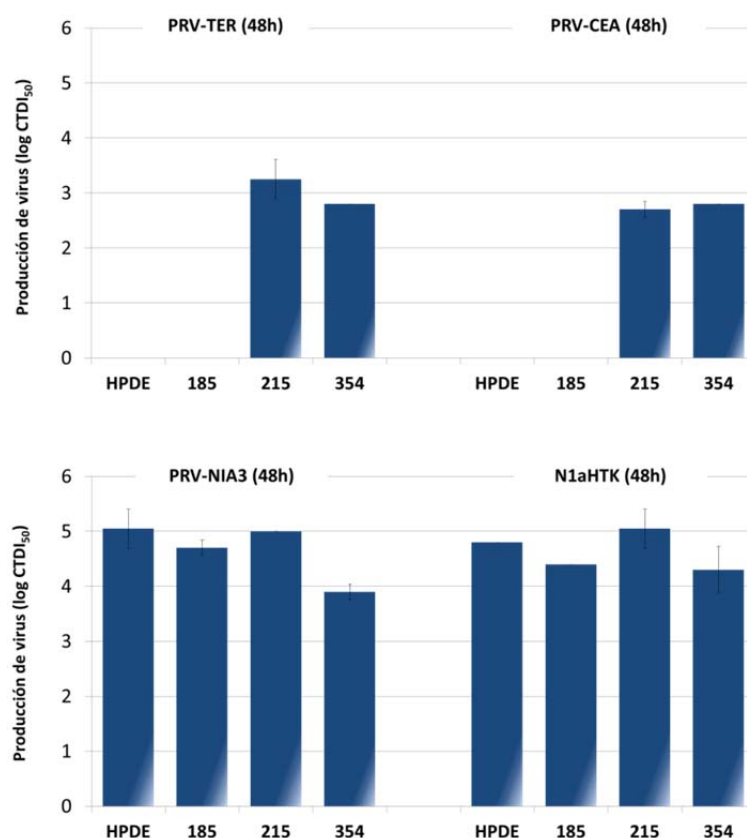
Se observó que hay diferencias de crecimiento entre los virus parentales y entre los virus recombinantes dependiendo del tipo celular (**Figuras 34 y 35**):

- **vBecker2 y PRV-BT90.** Se observa que el virus PRV-BT90 no es capaz de replicar en las líneas celulares HPDE, 185 y 354. En la línea 215 el virus PRV-BT90 alcanza un título 2,3 logs inferior al del vBecker2.
- **vBecker2 y PRV-T180TER.** El virus PRV-T180TER no es capaz de replicar en las líneas celulares HPDE y 185. En las otras líneas es el virus vBecker2 el que tiene mayores títulos de crecimiento. En las células 215, vBecker2 tiene un título 2 logs por encima de PRV-T180TER, mientras que en las células 354 la diferencia es de 1 logaritmo.
- **vBecker2 y PRV-T180CEA.** El virus PRV-T180CEA no es capaz de replicar en las líneas celulares HPDE y 185. En las otras líneas es el virus vBecker2 el que tiene mayores títulos de crecimiento. En las células 215, vBecker2 tiene un título 3,2 logs por encima de PRV-T180CEA, mientras que en las células 354 la diferencia es de 1 logaritmo.
- **PRV-BT90 y PRV-T180TER.** Ninguno de los dos virus es capaz de replicar en las líneas celulares HPDE y 185. En las células 215 ambos virus alcanzan títulos muy similares y en las 354 el PRV-BT90 es incapaz de replicar mientras que el PRV-T180TER tiene un título de 2,8 logs.
- **PRV-BT90 y PRV-T180CEA.** Ninguno de los dos virus es capaz de replicar en las líneas celulares HPDE y 185. En las células 215 el virus PRV-BT90 tiene un título 1 logaritmo superior al PRV-T180CEA. En las células 354 el PRV-BT90 es incapaz de replicar, mientras que el PRV-T180CE tiene un título de 2,8 logs.
- **vBecker2 y PRV-TER.** El virus PRV-TER no es capaz de replicar en las líneas celulares HPDE y 185. En las otras líneas es el virus vBecker2 el que tiene mayores títulos de crecimiento. En las células 215, vBecker2 tiene un título 1,9 logs por encima de PRV-TER, mientras que en las células 354 la diferencia es de 1,1 logs.

- **vBecker2 y PRV-CEA.** El virus PRV-CEA no es capaz de replicar en las líneas celulares HPDE y 185. En las otras líneas es el virus vBecker2 el que tiene mayores títulos de crecimiento. En las células 215, vBecker2 tiene un título 2,5 logs por encima de PRV-CEA, mientras que en las células 354 la diferencia es de 1,1 logs.
- **PRV-NIA3 y vBecker2.** Entre los dos virus parentales las diferencias de crecimiento obtenidas son mínimas en las líneas 215 y 354. Mientras que en células HPDE se observa un crecimiento de PRV-NIA3 de 2,2 logs mayor que PRV-NIA3 y 1 logaritmo mayor en las células 185.
- **PRV-NIA3 y N1aHTK.** Los datos de crecimiento entre ambos virus son muy similares en todas las líneas celulares.







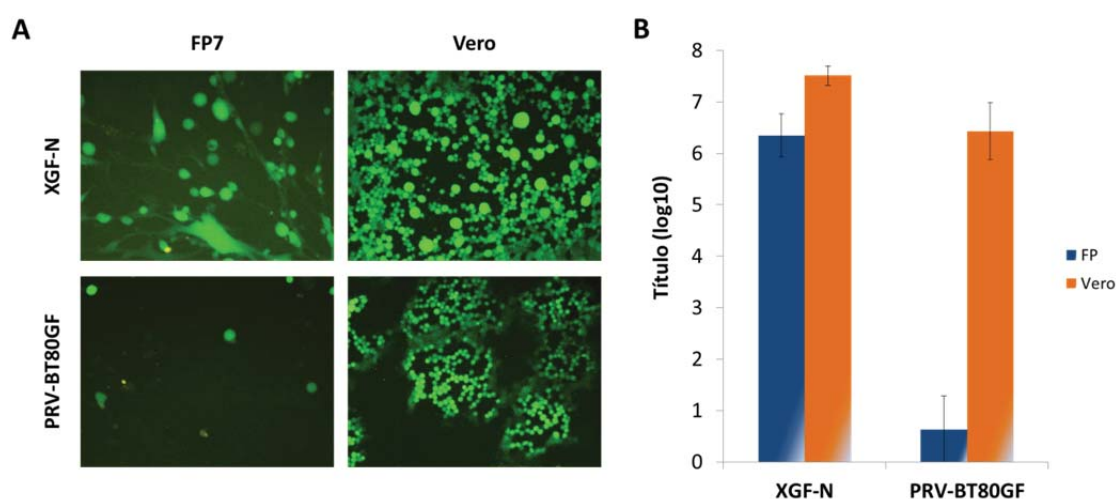
**Figura 35. Análisis de los ensayos de producción de virus en líneas primarias de cáncer de páncreas.** Estudio del crecimiento de los virus recombinantes en las líneas celulares HPDE, 185, 215 y 354 tras 72 horas de infección y a MOI 0,1.

## 5.5 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE VIRUS PRV RECOMBINANTES QUE EXPRESAN LA IE180 BAJO CONTROL DEL PROMOTOR INDUCIBLE POR TETRACICLINA

Una vez obtenidos y analizados los datos de producción de virus en las distintas líneas tumorales, se observó la peculiaridad de que el virus PRV-BT90 no es capaz de replicar en las células control FP y HPDE, mientras que sí lo hace en las líneas tumorales HeLa, U2OS, HT29 y 215. Este dato puede ser interesante a la hora de aumentar la selectividad de los virus recombinantes por las células tumorales. Por ello, se obtuvo el virus PRV-BT80GF, que tiene las mismas características que el PRV-BT90 y, además, expresa la EGFP, lo que facilita su detección. Así mismo, se decidió estudiar si el empleo del transactivador tTA sería capaz de aumentar la capacidad de replicación en células tumorales de los virus recombinantes que expresan la IE180 bajo control del promotor inducible por tetraciclina.

### 5.5.1 Ensayos de producción de virus en células no tumorales

Para confirmar los resultados obtenidos con el virus PRV-BT90, se realizó un análisis del crecimiento del virus PRV-BT80GF en células no tumorales, en el que se empleó como control de la infección el virus recombinante XGF-N, virus PRV deficiente en la glicoproteína gG y que expresa la EGFP (Viejo-Borbolla y col., 2010). Se realizó el mismo ensayo en células Vero para determinar la capacidad de replicación del PRV-BT80GF. Para ello se infectaron monocapas subconfluentes de células FP y Vero con los virus a MOI 0,05. A las 48 horas se recogieron las infecciones de las células Vero y a las 120 horas las infecciones de las células FP y se titularon en células Vero.



**Figura 36. Análisis de los ensayos de producción de virus en células no tumorales.** Análisis del crecimiento de los virus recombinantes XGF-N y PRV-BT80GF (MOI 0,05) en las líneas celulares FP y Vero. **A.** Imágenes de las células infectadas por los virus XGF-N y PRV-BT80GF (MOI 0,05) en células FP tras 120 horas de infección y en células Vero tras 48 horas de infección obtenidas por microscopía de fluorescencia. **B.** Estudio del crecimiento de los virus XGF-N y PRV-BT80GF en células FP tras 120 horas de infección y en células Vero tras 48 horas de infección, ambas a MOI 0,05.

Los resultados obtenidos muestran diferencias de crecimiento del virus PRV-BT80GF en los dos tipos de células (**Figura 36**). La más notable se da en las células FP, donde el virus XGF-N tiene un título de crecimiento de 6,4 logaritmos (logs) mientras que en el virus PRV-BT80GF es de 0,6 logs (**Figura 36B**). Estos resultados son similares a los obtenidos al infectar las células FP con el virus PRV-BT90 (apartado 5.4.1.2), ambos virus son capaces de infectarlas pero no de replicar en ellas. Así mismo, los resultados

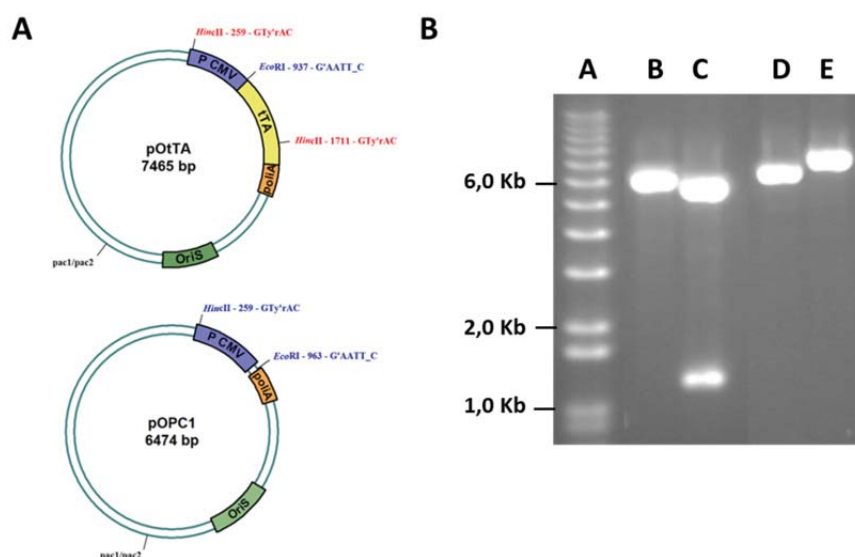
obtenidos en las células Vero confirman la capacidad de replicación del virus PRV-BT80GF, donde el virus XGF-N tiene un título de crecimiento de 7,5 logs y el PRV-BT80GF de 6,4 logs, una diferencia de 5,8 logs respecto a las células FP.

## 5.5.2 Propiedades biológicas del virus PRV-BT80GF

### 5.5.2.1 Caracterización del plásmido pOtTA

El plásmido pOtTA se construyó a partir del plásmido pUHD15-1 (Gossen y Bujard, 1992), con el objetivo de expresar el transactivador tTA, pudiendo así emplearlo para potenciar la actividad del promotor inducible por tetraciclina en los virus cuya IE180 está regulada por el mismo.

La caracterización del plásmido pOtTA se llevó a cabo mediante digestión enzimática y se empleó el plásmido pOPC1 como control (**Figura 37**). Se emplearon las enzimas HincII (origina dos fragmentos de 1,5 y 5,9 Kb en pOtTA y lineariza el pOPC1 dando un único fragmento de 6,4 Kb) y EcoRI (lineariza ambos plásmidos dando un único fragmento de 7,4 Kb en pOtTA y de 6,4 Kb en pOPC1).

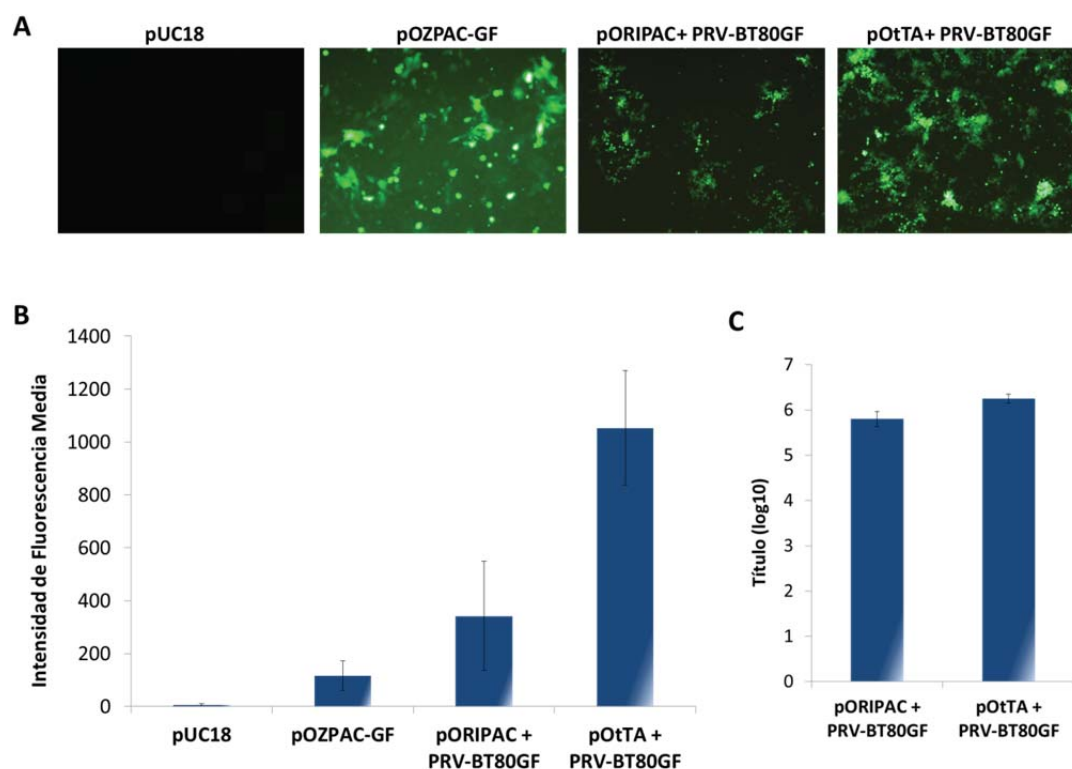


**Figura 37. Caracterización del plásmido pOtTA.** A. Mapas de restricción de los plásmidos pOtTA y pOPC1 donde se indica la posición de las dianas de restricción HincII y EcoRI empleadas para su caracterización. B. Marcador de tamaño de DNA 1 Kb Ladder (**carril A**); pOPC1 digerido con HincII (fragmento de 6,4 Kb) (**carril B**) y EcoRI (fragmento de 6,4 Kb) (**carril D**); pOtTA digerido con HincII (fragmentos de 1,5 y 5,9 Kb) (**carril C**) y EcoRI (fragmento de 7,4 Kb) (**carril E**).

### 5.5.2.2 Efecto del transactivador tTA sobre el promotor inducible por tetraciclina en el virus PRV-BT80GF

Para estudiar el efecto del transactivador tTA sobre la actividad del promotor inducible por tetraciclina en el contexto de una infección vírica, se analizó la producción de la EGFP por el virus recombinante PRV-BT80GF como indicador de su capacidad de replicación.

Para ello, se transfectaron células PK15 con los plásmidos pOtTA y pORIPAC, este último como control. A las 24 horas, las células se infectaron con el virus PRV-BT80GF a una MOI de 0,1. La expresión de la EGFP se detectó por microscopía de fluorescencia (**Figura 38A**). Las células se fijaron a las 24 horas post-infección y se valoró la expresión de la EGFP mediante citometría de flujo. Se empleó el plásmido pUC18 como control negativo de fluorescencia y el pOZPAC-GF como control positivo de fluorescencia. En los resultados obtenidos, se observa que la presencia del transactivador tTA induce la replicación del PRV-BT80GF, resultando en un aumento de la expresión de la EGFP de 3,1 veces respecto al ensayo control de PRV-BT80GF con el plásmido pORIPAC (**Figura 38B**).

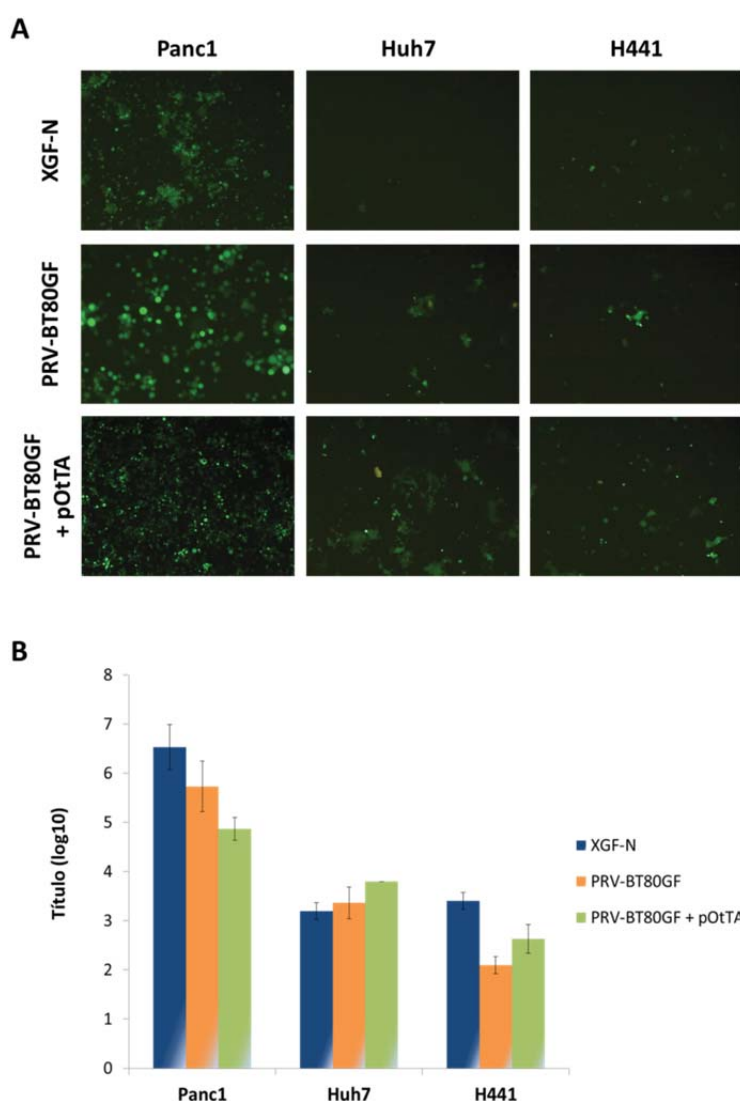


**Figura 38.** Análisis del efecto del transactivador tTA en la actividad del promotor inducible por tetraciclina. Transfección en PK15 de los plásmidos pORIPAC o pOtTA e infección con PRV-BT80GF a MOI 0,1. Los plásmidos pUC180 y pOZPAC-GF se emplearon como control negativo y positivo de la transfección, respectivamente. **A.** Imágenes de las células transfectadas e infectadas obtenidas por microscopía de fluorescencia 24 horas post-infección. **B.** Datos de la medición por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia media de las transfecciones-infecciones a las 24 horas post-infección. **C.** Análisis de la producción de PRV-BT80GF tras 24 horas de infección en células PK15 transfectadas con pOtTA o pORIPAC.

Para completar el análisis, se repitieron las transfecciones en células PK15 con los plásmidos pOtTA y pORIPAC. A las 24 horas, las células se infectaron con el virus PRV-BT80GF a una MOI de 0,1. A las 24 horas tras la infección, se recogieron las infecciones y se titularon en células Vero. En los resultados obtenidos, se observa un incremento del título de 0,5 logaritmos cuando el transactivador tTA está presente respecto al ensayo control de PRV-BT80GF con el plásmido pORIPAC (**Figura 38C**).

### 5.5.2.3 Ensayos de producción de virus en líneas celulares tumorales

Para estudiar los niveles de producción del virus recombinante PRV-BT80GF en presencia o ausencia del transactivador tTA, se realizó un análisis del crecimiento en cultivos de células de cáncer de páncreas (Panc1), de hígado (Huh7) y de pulmón (H441), en el que se empleó como control de la infección el virus recombinante XGF-N. Para ello se infectaron monocapas subconfluentes de células Panc1, Huh7 y H441 con los virus a MOI 0,1. Las infecciones se recogieron a las 48 horas y se titularon en células Vero.



**Figura 39. Análisis de los ensayos de producción de virus en células tumorales.** Análisis del crecimiento de los virus recombinantes XGF-N, PRV-BT80GF y PRV-BT80GF con el amplicón pOtTA (MOI 0,1) en las líneas tumorales Panc1, Huh7 y H441. **A.** Imágenes de las células infectadas obtenidas por microscopía de fluorescencia 48 horas post-infección. **B.** Estudio del crecimiento de los virus tras 48 horas de infección.

Se observó que PRV-BT80GF es capaz de replicar en las líneas tumorales, mostrando un comportamiento similar al virus control XGF-N respecto a su capacidad para infectar las distintas líneas, teniendo, además, un crecimiento de 2 o más logs superior en células Panc1 que en Huh7 o H441 (**Figura 39**). Además, hay diferencias de crecimiento entre el virus PRV-BT80GF y el virus PRV-BT80GF junto al amplicón (**Figura 39**).

- **Panc1.** Esta es la línea en la que se obtienen los mayores títulos en las infecciones. XGF-N tiene un título de crecimiento de 6,5 logs, PRV-BT80GF de 5,7 y PRV-BT80GF con el transactivador tTA de 4,9 logs.
- **Huh7.** XGF-N tiene un título de crecimiento de 3,2 logs, PRV-BT80GF de 3,4 y PRV-BT80GF con tTA de 3,8.
- **H441.** XGF-N tiene un título de crecimiento de 3,4, PRV-BT80GF de 2,1 y PRV-BT80GF con tTA de 2,6.

## Discusión

---



## 6.1 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS PROMOTORES TUMORALES HUMANOS hTERT Y CEA

Los tumores expresan un conjunto característico de genes, algunos de ellos son representativos de ciertos tipos específicos de cáncer mientras que otros lo son de un amplio grupo de distintos tipos de cáncer (Dorer y Nettelbeck, 2009). En el campo de la virología oncolítica se seleccionan promotores de genes específicos tumorales, con baja o nula actividad en células normales, para regular la transcripción de genes víricos esenciales con el fin de aumentar la selectividad y la capacidad oncolítica de los virus empleados (Dorer y Nettelbeck, 2009; Zeyauallah y col., 2012). En nuestro laboratorio se seleccionaron dos promotores de genes tumorales humanos, la telomerasa transcriptasa inversa (hTERT), activa en aproximadamente el 90% de los cánceres, y el antígeno carcinoembrionario (CEA), que a pesar de ser una molécula que se expresa en tejidos sanos, se encuentra sobre-expresado en varios tumores de origen epitelial como es el adenocarcinoma de colon.

### 6.1.1 Estudio de la actividad de los promotores tumorales

La actividad de los promotores tumorales hTERT y CEA se estudió utilizando la proteína EGFP como marcador de la expresión génica, para lo que en primer lugar, se definieron las secuencias del promotor de la transcripción de ambos genes tumorales. El promotor CEA se encuentra localizado en los primeros 400 nucleótidos por delante del inicio de la traducción (Schrewe y col., 1990). Esta región fue amplificada por PCR a partir de DNA de amnios humano. El fragmento amplificado se insertó en el plásmido pACEA-FG, en el que el promotor regula la expresión de la proteína EGFP. El mismo procedimiento se realizó con el promotor hTERT, obteniéndose el plásmido pZTERGF (Piñero, 2009). Para evaluar si las secuencias amplificadas funcionan como promotores se transfectaron células HeLa Tet-Off con los plásmidos pACEA-FG y pZTERGF. Mediante microscopía de fluorescencia se observaron células fluorescentes en ambas transfecciones (**Figura 16A**), confirmándose la actividad de las secuencias amplificadas, y se detectó al cuantificar por citometría de flujo que la fluorescencia producida por el

plásmido pZTERGF era el doble que para el pACEA-FG (**Figura 16B**), sugiriendo una mayor fuerza de transcripción para el promotor hTERT que para el CEA.

Como se ha comentado en la introducción, los genes inmediatamente tempranos de los herpesvirus funcionan como transactivadores de la expresión de genes tempranos y tardíos, por lo que aprovechamos esta característica para generar un sistema de transactivación que nos permite analizar de manera indirecta la capacidad de los promotores hTERT y CEA para dirigir la expresión de la proteína IE180 de PRV al medir la transactivación del promotor temprano de la gG de PRV, presente en el plásmido pZGF-SD4, en presencia de IE180. Para ello se construyeron los plásmidos pACEA180, en el que el promotor del CEA regula la expresión de IE180, y pATER180, en el que el promotor hTERT regula la expresión de IE180 (Piñero, 2009). Gracias a este sistema pudimos medir y confirmar la actividad de los promotores tumorales y la expresión de la proteína IE180, de forma indirecta, a través de la expresión de EGFP (**Figura 18**).

### **6.1.2 Efecto de las proteínas IE180 de PRV e ICP4 de HSV-1 sobre la actividad de los promotores tumorales**

Existen varios estudios en los que se describe a la IE180 como un potente transactivador, ya que es incluso capaz de activar la transcripción de promotores humanos como la topoisomerasa I (Wong y col., 1997) o la beta-globina (Green y col., 1983). Por ello, decidimos analizar el posible efecto de la IE180 sobre la actividad de los promotores tumorales hTERT y CEA. Este paso es necesario cuando la finalidad es construir un virus oncolítico, donde un promotor celular va a controlar la expresión de una proteína vírica que tiene fuertes propiedades de transactivación como la IE180. Además, por su homología con la IE180, incluimos como referencia en el estudio a la ICP4, una de las proteínas inmediatamente tempranas de HSV-1. ICP4 es la principal proteína reguladora de HSV-1, siendo esencial en su ciclo de replicación. Para ICP4 también se ha descrito su capacidad de activar la transcripción de promotores humanos como la ubiquitina B (Kemp y Latchman, 1988) y el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A) (Wuest y col., 2011). Así, para este ensayo se emplearon

plásmidos que expresan la IE180 (pAZT180) o la ICP4 (ptetICP4lac) bajo el control del promotor inducible por tetraciclina Ptet, el cual nos asegura una alta expresión de ambas proteínas víricas en las células HeLa Tet-Off, que fueron cotransfectados con plásmidos que expresan la EGFP bajo el control del promotor hTERT (pZTERGF; Piñero, 2009) o CEA (pACEAA-FG). En los resultados obtenidos observamos que ICP4 activa la transcripción de ambos promotores, mientras que IE180 reprime al promotor hTERT y activa al promotor CEA (**Figuras 21, 22 y 23**). IE180 e ICP4 tienen un alto grado de similitud y comparten dominios funcionales similares (Cheung, 1989; Vlcek y col., 1989) y ambas son capaces de activar la transcripción de promotores humanos, por lo que resulta sorprendente su comportamiento contrario respecto al promotor hTERT. Este comportamiento podría relacionarse a interacciones con factores celulares involucrados en la transcripción como el factor de transcripción II D (TFIID), ya que, a pesar de su homología, no se han identificado secuencias promotoras que estén únicamente involucradas en la estimulación transcripcional (Abmair y col., 1988). No obstante, se necesitan nuevos estudios para poder comprender a nivel molecular esta capacidad activadora o represora diferencial de la IE180.

Estos resultados avalan la necesidad de analizar la actividad de los promotores destinados a la obtención de virus oncolíticos, ya que se ha descrito que éstos pueden ver reducida su actividad e incluso perder su especificidad de tejido a causa de proteínas víricas con actividad transcripcional directa o indirecta (Dorer y Nettelbeck, 2009) o de secuencias reguladoras víricas (Hurtado y col., 2004). En nuestro caso, y conociendo la fuerte actividad reguladora de IE180, es necesario este estudio para asegurar que los promotores posean la suficiente fuerza transcripcional para conseguir los niveles de expresión mínimos de IE180 que aseguren el control de la replicación vírica.

## 6.2 CARACTERIZACIÓN DE VIRUS PRV RECOMBINANTES QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA IE180 BAJO CONTROL DE LOS PROMOTORES TUMORALES hTERT Y CEA

PRV ha sido empleado como vector vacunal en distintas enfermedades del cerdo (Hooft van Iddekinge y col., 1996; Hong y col., 2007; Lei, y col., 2016;) y como vector de expresión de proteínas foráneas (Irnaten y col., 2001; Prieto y col., 2002). En el año 2002 se hizo una primera aproximación en el empleo de PRV como agente oncolítico al analizar el crecimiento de distintas cepas mutantes de PRV en células tumorales humanas de neuroblastoma, glioblastoma y hepatoma, además de *in vivo* en tumores humanos y de ratón (Boldogkői y col., 2002). Estos resultados llevaron a la discusión sobre el posible uso de PRV como una nueva herramienta terapéutica (Boldogkői y Nógrádi, 2003), ya que, además de mantener las ventajas descritas para HSV-1, presenta nuevas ventajas para su uso como vector oncolítico al no ser un patógeno humano, lo que evita la pre-existencia de inmunidad y el riesgo de recombinación con virus PRV latentes (Prieto y col., 2002; Boldogkői y Nógrádi, 2003).

En este trabajo, se han construido cuatro virus PRV recombinantes que expresan la proteína inmediatamente temprana IE180 bajo el control de los promotores tumorales humanos hTERT y CEA. Dos de ellos, PRV-TER y PRV-CEA, poseen en su genoma una única copia de la IE180 expresada bajo control de un promotor tumoral. Y el otro par, PRV-T180TER y PRV-T180CEA, poseen dos copias de IE180, una de ellas expresada bajo control de un promotor tumoral y la otra bajo control del promotor inducible por tetraciclina (Ptet). La inserción de esta segunda copia de IE180 con el promotor Ptet se realizó con la intención de obtener mayores títulos víricos en los “stocks” al infectar células HeLa Tet-Off, donde el promotor Ptet se ve estimulado aumentando la expresión de IE180 y favoreciendo la replicación vírica. Así, al infectar células HeLa Tet-Off se producían “stocks” con títulos del orden de magnitud de  $10^7$  CTDI<sub>50</sub>/ml, mientras que en otras líneas celulares no se superaba el orden de magnitud de  $10^6$  CTDI<sub>50</sub>/ml (datos no mostrados). La correcta inserción de las construcciones en el genoma de PRV se analizó por PCR (**Figuras 25 y 26**) y, en el caso de los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA, además se detectó mediante RT-PCR la expresión del mRNA de la IE180 específicamente bajo control de los promotores tumorales (**Figura 27**).

### 6.2.1 Análisis de la expresión del gen IE180 en los virus recombinantes PRV-TER y PRV-CEA

Una vez obtenidos los virus recombinantes se analizó si se mantenía el comportamiento de inhibición y activación de los promotores hTERT y CEA, respectivamente, por parte de la IE180. Para ello se extrajo RNA para poder analizar por RTqPCR los niveles de expresión del mRNA de la proteína IE180 producidos por los recombinantes en comparación con el virus parental vBecker2. Así, y en comparación con vBecker2, se observó que para PRV-TER los niveles de expresión de IE180 bajo control del promotor hTERT se reducen ligeramente a las 12 hpi y aumentan 14 veces a las 24 hpi (**Figura 28**), mientras que para PRV-CEA los niveles de expresión de IE180 bajo control del promotor CEA aumentan 32 veces en ambos tiempos (**Figura 28**). Los datos obtenidos corroboraron el comportamiento regulador de IE180 observado anteriormente, esta vez englobándolo en el contexto de una infección vírica, y, dado que los experimentos de transfección se realizaron en distintas líneas celulares, podemos decir que este comportamiento no se produce exclusivamente en las células HeLa Tet-Off, sino que también es extensible a otra línea celular como las U2OS.

### 6.2.2 Análisis de la implicación de IE180 en inducción de apoptosis

Las infecciones víricas tienden a generar señales proapoptóticas celulares que inducen a la muerte celular y a la fagocitosis para limitar la replicación vírica y su dispersión (Roulston y col., 1999; Kotwal y col., 2012; Zhou y col., 2017;). Los virus herpes, al igual que otros virus DNA, codifican para proteínas que interfieren con esta respuesta apoptótica, promoviendo la supervivencia celular para beneficiar la replicación vírica y la producción de nuevos viriones (Aubert y col., 2001). PRV es un virus citocida que induce cambios rápidos y extensos en su hospedador y en cultivos celulares. Los efectos citopáticos dependen de la cepa y del tipo celular e incluyen inhibición de mitosis, formación de inclusiones intranucleares, redondeamiento celular y, ocasionalmente, formación de sincitios (Roizman y col., 2007). Se ha descrito que PRV es capaz de bloquear la apoptosis en neuronas del ganglio trigémino en su hospedador natural y al mismo tiempo de inducir apoptosis en muchas de las células

del sistema inmune infiltradas en las zonas infectadas del ganglio (Alemañ y col., 2001). No obstante, se ha visto que esta inhibición de la apoptosis en las neuronas es temporal y selectiva. Es decir, en tiempos tempranos de la infección no se detectan señales de apoptosis en las células neuronales infectadas, mientras que a las 48 horas tras la infección las células muestran características típicas de apoptosis (Marcaccini y col., 2006).

El efecto citopático observado en esta tesis en las infecciones de células U2OS con el virus parental vBecker2 se caracteriza principalmente por el redondeamiento de las células. Sin embargo, durante el análisis de los virus recombinantes observamos que las células U2OS infectadas con el virus PRV-CEA mostraban un efecto citopático más severo (**Figura 29**). La morfología que presentaban las células mostraba similitudes con la que se observa en casos de apoptosis, como la reducción del volumen o la alteración de la membrana plasmática en la que aparecen protuberancias (Taylor y col., 2008). El elemento que claramente diferencia a estos dos virus, y que pueda explicar este efecto citopático más severo, es la sobreexpresión de la IE180 por parte del PRV-CEA. Se ha sugerido que la IE180 puede inducir apoptosis, al detectarse un incremento de células neuronales apoptóticas en el cerebelo de ratones transgénicos que expresan la IE180 (Tomiooka y col., 2008). Con estos datos, se estudió si el efecto citopático causado por PRV-CEA se debía a la inducción de apoptosis en las células infectadas. Se realizaron ensayos de anexina V para medir apoptosis en células U2OS infectadas con vBecker2, PRV-TER o PRV-CEA. Observamos que el porcentaje de células en apoptosis tardía tras la infección con PRV-CEA aumentaba al 3,47% en comparación al 0,52% y 0,46% de células infectadas con vBecker2 o PRV-TER, respectivamente (**Figura 30**). Se observó un fenotipo similar cuando la IE180 era expresada por las células PK15-IE180 de manera condicional, confirmándose la inducción de apoptosis en estos casos (**Figura 31**). Adicionalmente, se confirmó la inducción de apoptosis por la IE180 mediante un estudio por Western blot de la escisión por caspasas de la poli-(ADP ribosa) polimerasa (PARP) en células U2OS infectadas con los virus vBecker2, PRV-TER o PRV-CEA (datos no mostrados; Lerma y col., 2016a). Se observó la presencia del producto de la escisión de PARP de 89 KDa en las infecciones con PRV-CEA a las 12 y 24 hpi, lo que se correlaciona con la sobre-

expresión de IE180 por este virus (**Figura 28**). Estos datos están en concordancia con el efecto regulador que ejerce la IE180 sobre cada promotor tumoral y permiten confirmar que la sobreexpresión de la IE180 induce apoptosis. Este hecho resulta interesante al compararlo con la proteína inmediatamente temprana ICP4 de HSV-1, para la que se han propuesto funciones anti-apoptóticas (Leopardi y Roizman, 1996). Sin embargo, esta función pro-apoptótica de IE180 podría representar una ventaja añadida en el contexto del diseño de vectores oncolíticos de PRV, ya que cuando su expresión está dirigida por su propio promotor IE180 es capaz de auto-regularse, produciendo los niveles necesarios para la replicación vírica sin que resulten tóxicos para la célula infectada, mientras que IE180 no es capaz de regular el promotor del CEA llevando a una sobre-expresión de la proteína, lo que hace que los virus repliquen preferentemente y al mismo tiempo induzcan apoptosis en células tumorales.

### 6.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS VIRUS RECOMBINANTES

La viroterapia oncolítica es una estrategia terapéutica que implica la destrucción de las células tumorales mediante la replicación vírica, y en la que es esencial atenuar esta replicación en células normales. Los mecanismos de seguridad son importantes en el diseño de virus oncolíticos por lo que deben cumplir con ciertas propiedades como no integrarse en el genoma celular, que no replique en células no tumorales o que, en caso de hacerlo, no cause enfermedades graves, y deben existir terapias específicas para su tratamiento. Los virus PRV recombinantes cumplen con estos criterios, ya que no se integran en el genoma celular, está descrito que no causan enfermedad en el hombre (Sawitzky, 1997) y existen varios fármacos antiherpéticos, generalmente análogos de nucleósidos, como el GCV, que son procesados por la TK vírica (Balfour, 1999). Sin embargo, la TK de PRV tiene una menor especificidad de sustrato que la de HSV-1 (Maga y col., 1993), produciéndose una baja sensibilidad de la infección al nucleósido al producirse poca fosforilación del mismo (Gómez-Sebastián y Tabarés, 2004). Previamente, en nuestro laboratorio se construyó el virus PRV recombinante N1aHTK que expresa la proteína TK de HSV-1 (Gómez-Sebastián y Tabarés, 2004), permitiendo no solo una mayor sensibilidad a los fármacos sino también su uso para terapias suicidas TK/GCV (Dachs y col., 2009; Greco y col., 2015).

Se sabe que la presencia de Gal $\alpha$ 1–3Gal $\beta$ 1–4GlcNAc-R (epítipo  $\alpha$ -gal) en la superficie de los viriones de PRV obtenidos en células de cerdo es detectada por anticuerpos anti- $\alpha$ -gal presentes en el suero humano, llevando a la neutralización del virus (Hayashi y col., 2004). Este epítipo no se expresa en los denominados primates del viejo mundo (familia *Cercopithecidae*) ni en humanos, por lo que los viriones de PRV obtenidos en células derivadas de estos primates o humanas, no presentan el epítipo en su superficie y no son reconocidos por los anticuerpos. La incorporación del gen TK de HSV-1 en el genoma de PRV ayudaría a mejorar los niveles de bioseguridad para su empleo como virus oncolítico en humanos.

El crecimiento de los virus PRV recombinantes construidos en esta tesis se estudió en líneas celulares humanas de cáncer cervical (HeLa), osteosarcoma (U2OS) y cáncer de colon (HT29), usando fibroblastos de pulmón (FP) como línea celular no tumoral. Además, se analizó su crecimiento en las líneas primarias de cáncer de páncreas 185, 215 y 354, empleando células epiteliales del conducto ductal pancreático humano (HPDE) como control de células no tumorales. Al comienzo de este estudio se partió con la hipótesis de que la replicación de los virus recombinantes se vería favorecida en aquellas células que expresaran más activamente los genes hTERT y CEA, por lo que se realizó un análisis mediante RT-PCR para conocer los niveles de expresión de los genes tumorales en las líneas celulares descritas (datos no mostrados). Esta hipótesis tuvo que ser descartada al comparar los resultados de los niveles de expresión de los genes tumorales con los datos de crecimiento de los virus recombinantes en estas células, ya que no se encontró la correlación esperada en todos los casos. Para poder explicar esta situación debemos referirnos nuevamente al hecho de que en la construcción de los virus se han empleado promotores sin secuencias de regulación, por lo que el control de la transcripción génica no tiene que ser igual al que encontramos en las células.

Respecto al análisis de crecimiento vírico, los datos recogidos revelaron que los virus PRV recombinantes replican mejor en células tumorales que en normales. En comparación con su virus parental vBecker2, los virus recombinantes muestran una reducción de título entre 3 y 4 logaritmos al infectar las células control FP, mientras que solo se observa una reducción de título entre 1 y 3 logaritmos cuando se infectan



las células tumorales U2OS, HeLa, HT29, 215 y 354. Así mismo, resulta interesante que no se detecte crecimiento de los virus recombinantes en las células HPDE y 185, comportamiento que no es debido a que estas líneas no expresen los receptores de entrada de PRV ya que el virus parental vBecker2 es capaz de replicar en ambas. El virus PRV-BT90, que expresa la IE180 bajo el control del promotor Ptet (Muñoz y col., 2010), se empleó como control para los virus recombinantes PRV-T180TER y PRV-T180CEA. De los resultados obtenidos se deduce que el promotor inducible por tetraciclina no es funcional en las células control FP, ya que no se detectó crecimiento de este virus mientras que sí se detectó para los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA (**Figura 33**). En células tumorales el crecimiento fue el mismo que para los virus recombinantes, deduciéndose una fuerte activación en estas células del promotor mínimo de CMV contenido en el promotor Ptet (**Figura 33**). Así mismo, al analizar los datos recogidos al infectar las líneas primarias de cáncer de páncreas, observamos que únicamente crece en la línea 215 (**Figura 35**). Se ha demostrado que el interferón alfa y beta inhibe la expresión génica regulada por el promotor de CMV (Harms y Splitter, 1995; Sainz y col., 2005), al analizarse en el laboratorio los niveles de producción de interferón de las líneas primarias de cáncer de páncreas (Sainz B. Jr., datos no mostrados) se observa una correlación inversa entre los niveles de interferón y el crecimiento del virus PRV-BT90, siendo la línea 215 en la que se detectaron los niveles más bajos de IFN y la única donde PRV-BT90 es capaz de crecer. Esto indica que el crecimiento de los virus recombinantes detectado en la línea 354 es debido únicamente a la regulación de los promotores tumorales. En estos resultados hay que tener en cuenta que la concentración de los virus PRV-T180TER y PRV-T180CEA, titulados en células U2OS, tiene un logaritmo menos que si se titulan en células HeLa Tet-Off (datos no mostrados), ya que en estas células, al activarse el promotor Ptet, hay mayor sensibilidad para su detección. Mencionar también que los títulos de crecimiento obtenidos para el virus recombinante PRV-T180CEA son un logaritmo menor de lo esperado, al compararlo con PRV-BT90, en las células HeLa, HT29 y 215. Como ya se ha comentado anteriormente, este virus, junto con el PRV-T180TER, se construyó con la intención de obtener mayores títulos en los “stocks” al infectar células HeLa Tet-Off. Este objetivo se cumplió al conseguir aumentar el título del virus pero se redujo la expresión de la copia de la IE180 controlada por el promotor CEA, lo

que hace que este virus no produzca apoptosis como el PRV-CEA (datos no mostrados). Estas diferencias podrían ser debidas que la expresión de los promotores Ptet y CEA en el PRV-T180CEA haga que interfieran el uno con el otro, haciendo que disminuya la actividad del CEA, aunque el análisis de estos resultados se profundizará en el futuro.

El virus recombinante N1aHTK muestra un patrón de crecimiento similar al de su parental PRV-NIA3 (**Figuras 33 y 35**), tanto en células tumorales como en no tumorales, deduciéndose que la incorporación del gen TK de HSV-1 en el genoma de PRV no afecta a su capacidad de replicación. Por lo que en el futuro, se insertará este gen en los virus recombinantes con el fin de aumentar su capacidad oncolítica.

Por otra parte, resulta sorprendente que los datos de crecimiento de los virus N1aHTK y PRV-NIA3 en las células control FP y HPDE sean distintos a los obtenidos con el virus vBecker2. vBecker2 tiene mayor capacidad para infectar las células FP, mientras que N1aHTK y PRV-NIA3 muestran una reducción de título de 2 logaritmos en estas células (**Figura 33**). Al analizar su crecimiento en las células HPDE nos encontramos con la situación inversa, N1aHTK y PRV-NIA3 tienen mayor capacidad de infección y vBecker2 reduce su crecimiento en 2 logaritmos (**Figura 35**). Estos resultados crean la necesidad de realizar futuros estudios, en más líneas celulares o de entrada vírica, que ayuden a comprender las bases de este comportamiento diferencial entre distintas cepas de PRV al infectar células no tumorales humanas, ya que podría ser explotado a la hora de seleccionar la cepa para diseñar virus PRV oncolíticos dependiendo del tejido diana, ayudando a reducir la toxicidad en las células sanas.

### **6.3.1 Propiedades biológicas de virus PRV recombinantes que expresan la IE180 bajo control del promotor inducible por tetraciclina**

El sistema de regulación transcripcional mediante tetraciclina ha sido ampliamente utilizado en células eucariotas, tanto en investigación básica como aplicado en terapia génica (Das y col., 2016). Este sistema consiste en un promotor mínimo de CMV que contiene el operador (tetO), al que se unen transactivadores sintéticos (tTA o rtTA), en presencia o ausencia de tetraciclina, regulando su

transcripción. El promotor inducible por tetraciclina (Ptet) presenta una actividad basal dependiendo del tipo celular (Gould y Chernajovsky, 2004). Esta actividad basal permite la replicación del virus PRV-BT90 en células Vero (Muñoz y col., 2011). La particularidad observada en el virus PRV-BT90, que es incapaz de replicar en las células control FP y HPDE, puede ser interesante a la hora de aumentar la selectividad de los virus recombinantes por células tumorales. Con el fin de aumentar su sensibilidad y detección, se obtuvo el virus PRV-BT80GF, que expresa la proteína EGFP fluorescente y, además, la expresión de la proteína IE180 está regulada por el promotor Ptet como ocurre en el virus PRV-BT90. Los resultados obtenidos de su análisis de crecimiento en células FP confirman que el virus es capaz de infectar pero el promotor inducible por tetraciclina no es funcional en estas células, ya que su crecimiento fue de 0,6 logaritmos, mostrando una reducción de título de 6 logaritmos respecto al virus control XGF-N (**Figura 36**). En células Vero el crecimiento fue prácticamente el mismo para ambos virus (**Figura 36**), reduciéndose la diferencia de título a 1 logaritmo, lo que confirma la capacidad de replicación del virus PRV-BT80GF y, por consiguiente, la funcionalidad del promotor Ptet.

A continuación, se decidió estudiar el efecto del transactivador tTA sobre la actividad del promotor inducible por tetraciclina que controla la replicación del virus PRV-BT80GF. Para ello, se transfectaron células PK15 con un plásmido que expresa el tTA (pOtTA) y se infectaron con PRV-BT80GF. Mediante microscopía de fluorescencia se observó un aumento de fluorescencia al compararlo con el ensayo control (**Figura 38A**) y se detectó, al cuantificar por citometría de flujo, que la fluorescencia producida por el virus con el transactivador era 3 veces superior que la producida por el ensayo control (**Figura 38B**), sugiriendo que el transactivador tTA es capaz de aumentar la capacidad de replicación del virus PRV-BT80GF. Sin embargo, al cuantificar la producción de virus se vio que solo se producía un aumento de 0,5 logaritmos con el transactivador tTA respecto al ensayo control (**Figura 38C**). Estos resultados sugieren la posibilidad de que se esté produciendo apoptosis en las células infectadas al haber una mayor expresión de IE180 por la acción del tTA, lo que explicaría el escaso aumento en la producción de virus respecto al control.

El crecimiento del virus PRV-BT80GF, en presencia o ausencia del transactivador tTA, se estudió en líneas celulares humanas de cáncer de páncreas (Panc1), de hígado (Huh7) y de pulmón (H441). Los datos obtenidos muestran que PRV-BT80GF presenta un comportamiento similar al virus control XGF-N respecto a su capacidad para infectar las distintas líneas tumorales, llamando la atención la alta capacidad de replicación de PRV-BT80GF en células Panc1 en relación a las células Huh7 y H441, siendo esta diferencia de dos o más logaritmos (**Figura 39B**). Así mismo, se observa una reducción de título de PRV-BT80GF en presencia del transactivador de 0,8 logaritmos en células Panc1, mientras que hay un aumento de 0,4 logaritmos en las células Huh7 y de 0,5 logaritmos en las H441 (**Figura 39B**).

Se ha descrito en varios estudios que la actividad del promotor inducible por tetraciclina puede verse afectada por diversos factores endógenos celulares. La región tetO del promotor posee secuencias ISRE de respuesta a interferón alfa que estimula la actividad basal del promotor (Rang y Will, 2000) y secuencias de unión para los factores de transcripción GATA que disminuyen la actividad basal (Gould y Chernajovsky, 2004), mientras que el promotor mínimo de CMV también posee secuencias de unión de factores de transcripción como AP2 o CREB (Gould y Chernajovsky, 2004). Se ha visto que los tumores de pacientes con cáncer de páncreas, además de otros tipos de tumores, tienen un nivel basal de activación de la vía de interferón tipo I (Monsurrò y col., 2010), incluso se ha descrito que las células primarias de cáncer de páncreas secretan interferón tipo I (Sainz y col., 2014), lo que podría explicar el motivo de que los virus con un promotor inducible por tetraciclina sean más activos y eficientes en estas células. Además, se ha visto que las proteínas ICP4, ICP27, ICP0 y VP16 del virus HSV-1 también son capaces de estimular la actividad del promotor Ptet (Herrlinger y col., 2000). La estimulación o inhibición del promotor inducible por tetraciclina por factores celulares endógenos es dependiente del tipo celular analizado (Rang y Will, 2000; Gould y Chernajovsky, 2004), lo que genera la necesidad de realizar futuros estudios para comprender qué factores celulares presentes en las células tumorales están implicados en la replicación de los virus PRV-BT90 y PRV-BT80GF.

La actividad oncolítica de PRV ha sido comparada con la de otros virus para el tratamiento de glioblastoma (Wollman y col., 2005). El objetivo de este trabajo era medir la actividad oncolítica de los virus en base a su capacidad para infectar de manera selectiva células tumorales y de su replicación y propagación a través de un tumor sólido, para lo que marcaron los virus con GFP. En los resultados concluyeron que: (i) PRV es capaz de infectar y matar células de glioblastoma cuando se infecta a MOI 50, mientras que a MOI 1 es ineficaz debido al rápido crecimiento de las células, y (ii) PRV no infecta de manera selectiva las células de glioblastoma, ya que mostraba una alta afinidad por fibroblastos humanos no tumorales. Esta afinidad por las células humanas no tumorales la hemos observado al infectar las células FP y HPDE con los virus parentales vBecker2 y PRV-NIA3, pero también hemos demostrado que se puede disminuir al construir virus recombinantes cuya transcripción está regulada por promotores tumorales. Se ha desarrollado un virus PRV que expresa su propia gD y la TK de HSV-1 bajo el control del promotor HER-2/neu, un proto-oncogen que se sobreexpresa en cáncer de vejiga (Shiau y col., 2007). Observaron que el virus recombinante replicaba y lisaba de manera selectiva células de cáncer de vejiga que sobreexpresaban HER-2/neu y que en experimentos *in vivo* en ratones prolongaba su supervivencia y retardaba el crecimiento del tumor.

En los últimos años ha habido avances significativos en el tratamiento del cáncer, entre ellos los virus oncolíticos aparecen como una nueva opción terapéutica. En base a los estudios clínicos realizados, el virus Talimogén laherparepvec (T-VEC) se ha convertido en el primer virus oncolítico aprobado en Europa (EMA, 2015), Estados Unidos (FDA, 2015) y Australia (TGA, 2016) (Pol y col., 2016; Rehman y col., 2016). El T-VEC procede de un virus HSV-1 modificado para infectar las células de melanoma y estimular el sistema inmune al expresar el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Rehman y col., 2016). Gracias a que T-VEC presenta un perfil de seguridad tolerable, es altamente efectivo en las lesiones tratadas y promueve la inmunidad antitumoral, se están realizando ensayos clínicos en combinación con otras inmunoterapias (Puzanov y col., 2016) y quimioradioterapias (Harrington y col., 2010). La aprobación de T-VEC para su uso clínico abre las puertas al desarrollo de nuevas terapias basadas en los virus oncolíticos.

A pesar de que el estudio para el empleo de PRV como vector oncolítico se encuentra en fases muy tempranas, los resultados obtenidos hasta el momento son prometedores y muestran el gran potencial de PRV para este fin. A los que hay que sumar los obtenidos en esta tesis, donde se han construido unos virus recombinantes en los que la expresión de su única proteína inmediatamente temprana se encuentra regulada bajo el control de promotores tumorales o por el promotor inducible por tetraciclina, con lo que se ha conseguido una menor tasa de replicación en células no tumorales respecto a las células tumorales, disminuyendo así su toxicidad. Además, se ha demostrado y confirmado la acción pro-apoptótica de la proteína IE180, una característica que puede representar una ventaja a la hora de desarrollar vectores oncolíticos basados en PRV. Gracias a la sencilla manipulación genética de PRV se podrán mejorar en un futuro los vectores obtenidos, ayudando a reducir aún más su toxicidad en células no tumorales y a aumentar su capacidad para infectar y replicar en células cancerígenas, ayudando a su eliminación bien por la inducción de apoptosis o mediante terapias suicidas como el sistema TK/GCV.

## Conclusiones

---

1. Se han realizado análisis del efecto de las proteínas IE180 de PRV e ICP4 de HSV-1 sobre la actividad de los promotores tumorales humanos de la subunidad catalítica telomerasa transcriptasa inversa (hTERT) y del antígeno carcinoembrionario (CEA) deduciéndose que:
  - a. La proteína IE180 de PRV inhibe la expresión génica bajo el control del promotor hTERT, mientras que la proteína ICP4 de HSV-1 aumenta esta expresión.
  - b. La proteína IE180 de PRV y la ICP4 de HSV-1 aumentan la expresión génica bajo el control del promotor del CEA.
2. Se han obtenido virus PRV recombinantes en los que la expresión de la IE180 se encuentra regulada por los promotores tumorales hTERT o CEA: PRV-TER, PRV-CEA, PRV-T180TER y PRV-T180CEA.
3. Ambos promotores tumorales pueden sustituir funcionalmente el promotor de la IE180 en los virus recombinantes PRV-TER y PRV-CEA. Sin embargo, en el PRV-CEA se produce una sobreexpresión de la IE180 en relación con la expresión del PRV-TER y el virus parental vBecker2.
4. La sobreexpresión de la IE180 en células U2OS infectadas con PRV-CEA se acompaña de apoptosis. Esta apoptosis también se detecta en células PK15-IE180 inducidas con doxiciclina.
5. Los virus recombinantes replican preferentemente en células tumorales que en células control no tumorales, llamando la atención la falta de replicación del PRV-BT90 en células no tumorales.
6. Las cepas vBecker2 y NIA3 de PRV muestran un crecimiento diferencial en las células control no tumorales.



7. El virus recombinante PRV-BT80GF mostró una replicación residual en células no tumorales y una alta replicación en células Panc1, siendo mayor que en células Huh7 y H441.
8. Los virus PRV recombinantes podrían ser candidatos potenciales para el desarrollo de virus oncolíticos.

## **Bibliografía**

---

Abmayr, S. M., Workman, J. L., Roeder, R. G. 1988. The pseudorabies immediate early protein stimulates in vitro transcription by facilitating TFIID: promoter interactions. *Genes Dev.* 2: 542-553.

Aghi, M., Martuza, R. L. 2005. Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene* 24: 7802-7816.

Alemañ, N., Quiroga, M. I., López-Peña, M., Vázquez, S., Guerrero, F. H., Nieto, J. M. 2001. Induction and inhibition of apoptosis by pseudorabies virus in the trigeminal ganglion during acute infection of swine. *J. Virol.* 75: 469-479.

Aubert, M., Blaho, J. A. 2001. Modulation of apoptosis during herpes simplex virus infection in human cells. *Microbes Infect.* 3: 859-866.

Balfour, H. H. 1999. Antiviral drugs. *N. Engl. J. Med.* 340: 1255-1268.

Bell, J., McFadden, G. 2014. Viruses for tumor therapy. *Cell Host Microbe* 15: 260-265.

Bello-Morales, R., Crespillo, A. J., García, B., Dorado, L. A., Martín, B., Tabarés, E., Krummenacher, C., de Castro, F., López-Guerrero, J. A. 2014. The effect of cellular differentiation on HSV-1 infection of oligodendrocytic cells. *PLoS ONE* 9: e89141.

Ben-Porat, T., Kaplan, A. S. 1976. A comparison of two populations of defective, interfering pseudorabies virus particles. *Virology* 72: 471-479.

Bhatia, S., Menezes, M. E., Das, S. K., Emdad, L., Dasgupta, S., Wang, X. Y., Sarkar, D., Fisher, P. B. 2013. Innovative approaches for enhancing cancer gene therapy. *Discov. Med.* 15: 309-317.

Boldogkői, Z., Bratincsák, A., Fodor, I. 2002. Evaluation of pseudorabies virus as a gene transfer vector and an oncolytic agent for human tumor cells. *Anticancer Res.* 22: 2153-2160.

Boldogkői, Z., Nógrádi, A. 2003. Gene and cancer therapy - pseudorabies virus: a novel research and therapeutic tool? *Curr. Gene Ther.* 3: 155-182.

Camacho, A., Tabarés, E. 1996. Characterization of the genes, including that encoding the viral proteinase, contained in BamHI restriction fragment 9 of the pseudorabies virus genome. *J. Gen. Virol.* 77: 1865-1874.

Campadelli-Fiume, G., de Giovanni, C., Gatta, V., Nanni, P., Lollini, P. L., Menotti, L. 2011. Rethinking herpes simplex virus: the way to oncolytic agents. *Rev. Med. Virol.* 21: 213-216.

Chang, C. D., Lin, P. Y., Liao, M. H., Chang, C. I., Hsu, J. L., Yu, F. L., Wu, H. Y., Shih, W. L. 2013. Suppression of apoptosis by pseudorabies virus US3 protein kinase through the activation of PI3-K/Akt and NF- $\kappa$ B pathways. *Res. Vet. Sci.* 95: 764-774.

Cheung, A. K. 1989. DNA nucleotide sequence analysis of the immediate-early gene of pseudorabies virus. *Nucleic Acids Res.* 17: 4637-4646.

Chiocca, E. A., Rabkin, S. D. 2014. Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* 2: 295-300.

Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

Coligan, J. E., Egan, M. L., Todd, C. W. 1972. Detection of carcinoembryonic antigen by radioimmune assay. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 35: 427-432.

Collins, K., Mitchel, J. R. 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21: 564-579.

Cong, Y. S., Wen, J., Bacchetti, S. 1999. The human telomerase catalytic subunit hTERT organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum. Mol. Genet.* 8: 137-142.

- Dachs, G. U., Hunt, M. A., Syddall, S., Singleton, D. C., Patterson, A. V. 2009. Bystander or no bystander for gene directed enzyme prodrug therapy. *Molecules* 14: 4517-4545.
- Daniel, M., Peek, G. W., Tollefsbol, T. O. 2012. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 498: 135-146.
- Das, A. T., Tenenbaum, L., Berkhout, B. 2016. Tet-on systems for doxycycline-inducible gene expression. *Curr. Gene Ther.* 16: 156-167.
- Davison, A. J. 2010. Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* 143: 52-69.
- Díez, I. 2012. Application of pseudorabies virus amplicons as vectors in vaccine development. Master Thesis in Biotechnology of Microorganisms, Universidad Autónoma de Madrid.
- Dorer, D. E., Nettelbeck, D. M. 2009. Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61: 554-571.
- Duffy, M. J. 2001. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin. Chem.* 47: 624-630.
- Dunbar, C. E., High, K. A., Joung, J. K., Kohn, D. B., Ozawa, K., Sadelain, M. 2018. Gene therapy comes of age. *Science* 359: 175.
- Enquist, L. W., Husak, P. J., Banfield, B. W., Smith, G. A. 1998. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv. Virus Res.* 51: 237-347.
- Favoreel, H. W., Van Minnebruggen, G., Adriaensen, D., Nauwynck H. J. 2005. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 8990-8995.

Fuchs, W., Klupp, B. G., Granzow, H., Rziha, H. J., Mettenleiter, T. C. 1996. Identification and characterization of the pseudorabies virus UL3.5, which is involved in virus egress. *J. Virol.* 70: 3517-3527.

Ganly, I., Kirn, D., Eckhardt, S. G., Rodriguez, G. I., Soutar, D. S., Otto, R., Robertson, A. G., Park, O., Gulley, M. L., Heise, C., Von Hoff, D. D., Kaye, S. B. 2000. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* 6: 798-806.

Geenen, K., Favoreel, H. W., Olsen, L. A., Enquist, L. W., Nauwynck, H. J. 2005. The pseudorabies virus US3 protein kinase possesses anti-apoptotic activity that protects cells from apoptosis during infection and after treatment with sorbitol or staurosporine. *Virology* 331: 144-150.

Geller, A. I., During, M. J., Haycock, J. W., Freese, A., Neve, R. 1993. Long-term increases in neurotransmitter release from neuronal cells expressing a constitutively active adenylate cyclase from a herpes simplex virus type 1 vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 7603-7607.

Gómez-Sebastián, S., Tabarés, E. 2004. Negative regulation of herpes simplex virus type 1 ICP4 promoter by IE180 protein of pseudorabies virus. *J. Gen. Virol.* 85: 2125-2130.

Gossen, M., Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 5547-5551.

Gould, D. J., Chernajovsky, Y. 2004. Endogenous GATA factors bind the core sequence of the tetO and influence gene regulation with the tetracycline system. *Mol. Ther.* 10: 127-138.

Granzow, H., Weiland, F., Jöns, A., Klupp, B. G., Karger, A., Mettenleiter, T. C. 1997. Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J. Virol.* 71: 2072-2082.

- Granzow, H., Klupp, B. G., Mettenleiter, T. C. 2005. Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study. *J. Virol.* 79: 3200-3205.
- Greco, R., Oliveira, G., Stanghellini, M. T., Vago, L., Bondanza, A., Peccatori, J., Cieri, N., Markt, S., Mastaglio, S., Bordignon, C., Bonini, C., Cicci, F. 2015. Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene. *Front. Pharmacol.* 6: 95.
- Green, M. R., Treisman, R., Maniatis, T. 1983. Transcriptional activation of cloned human  $\beta$ -globin genes by viral immediate-early gene products. *Cell* 35: 137-148.
- Hammarström, S. 1999. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol.* 9: 67-81.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harms, J. S., Splitter, G. A. 1995. Interferon- $\gamma$  inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter. *Hum. Gene Ther.* 6: 1291-1297.
- Harper, L., Demarchi, J., Ben-Porat, T. 1986. Sequence of the genome ends and the junction between the ends in concatemeric DNA of pseudorabies virus. *J. Virol.* 60: 1183-1185.
- Harrington, K., Hingorani, M., Tanay, M. A., Hickey, J., Bhide, S. A., Clarke, P. M., Renouf, L. C., Thway, K., Sibbain, A., McNeish, I. A., Newbold, K. L., Goldsweig, H., Coffin, R., Nutting, C. 2010. Phase I/II study of oncolytic HSV<sup>GM-CSF</sup> in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* 16: 4005-4015.

Harrington, K., Puzanov, I., Hecht, J. R., Hodi, F. S., Szabo, Z., Murugappan, S., Kaufman, H. L. 2015. Clinical development of talimogene laherparepvec (T-VEC): a modified herpes simplex virus type-1-derived oncolytic immunotherapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 15: 1389-1403.

Hauck, W., Stanners, C. 1995. Transcriptional regulation of the carcinoembryonic antigen gene. *J. Biol. Chem.* 24: 3602-3610.

Hayashi, S., Ogawa, S., Takashima, Y., Otsuka, H. 2004. The neutralization of pseudorabies virus by anti- $\alpha$ -galactocyl natural antibody in normal serum. *Virus Res.* 99: 1-7.

Hernández-Alcoceba, R. 2011. Recent advances in oncolytic virus design. *Clin. Transl. Oncol.* 13: 229-239.

Herrlinger, U., Pechan, P. A., Jacobs, A. H., Woiciechowski, C., Rainov, N. G., Fraefel, C., Paulus, W., Reeves, S. A. 2000. HSV-1 infected cell proteins influence tetracycline-regulated transgene expression. *J. Gene. Med.* 2: 379-389.

Homa, F. L., Brown, J. C. 1997. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev. Med. Virol.* 7: 107-122.

Hong, Q., Qian, P., Li, X-M., Yu, X-L., Chen, H-C. 2007. A recombinant pseudorabies virus co-expressing capsid proteins precursor P1-2A of FMDV and VP2 protein of porcine parvovirus: a trivalent vaccine candidate. *Biotechnol. Lett.* 29: 1677-1683.

Hooft van Iddekinge, B. J. L., de Wind, N., Wensvoort, G., Kimman, T. G., Gielkens, A. L. J., Moormann, R. J. M. 1996. Comparison of the protective efficacy of recombinant pseudorabies viruses against pseudorabies and classical swine fever in pigs; influence of different promoters on gene expression and on protection. *Vaccine* 14: 6-12.



Horikawa, I., Cable, P. L., Afshari, C., Barrett, C. 1999. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res.* 59: 826-830.

Hurtado Picó, A., Wang, X., Sipo, I., Siemetzki, U., Eberle, J., Poller, W., Fechner, H. 2005. Viral and nonviral factors causing nonspecific replication of tumor- and tissue-specific promoter-dependent oncolytic adenoviruses. *Mol. Ther.* 11: 563-577.

Hutzen, B., Bid, H. K., Houghton, P. J., Pierson, C. R., Powell, K., Bratasz, A., Raffel, C., Studebaker, A. W. 2014. Treatment of medulloblastoma with oncolytic measles viruses expressing the angiogenesis inhibitors endostatin and angiostatin. *BMC Cancer* 14: 206.

Ihara, S., Feldman, L., Watanabe, S., Ben-Porat, T. 1983. Characterization of the immediate-early functions of pseudorabies virus. *Virology* 131: 437-454.

Irnatén, M., Neff, R. A., Wang, J., Loewy, A. D., Mettenleiter, T. C., Mendelowitz, D. 2000. Activity of cardiorespiratory networks revealed by transsynaptic virus expressing GFP. *J. Neurophysiol.* 85: 435-438.

Johnson, D. B., Puzanov, I., Kelley, M. C. 2016. Talimogene laherparepvec (T-VEC) for the treatment of advanced melanoma. *Immunotherapy* 7: 611-619.

Karjoo, Z., Chen, X., Hatefi, A. 2017. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99: 113-128.

Kemp, L. M., Latzman, D. S. 1988. The herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP4 specifically induces increased transcription of the human ubiquitin B gene without affecting the ubiquitin A and C genes. *Virology* 166: 258-261.

Klupp, B. G., Granzow, H., Mettenleiter, T. C. 2001. Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J. Gen. Virol.* 82: 2363-2371.

Klupp, B. G., Hengartner, C. J., Mettenleiter, T. C., Enquist, L. W. 2004. Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome. *J. Virol.* 78: 424-440.

Kotwal, G. J., Hatch, S., Marshall, W. L. 2012. Viral infection: an evolving insight into the signal transduction pathways responsible for the innate immune response. *Adv. Virol.* 2012: 131457.

Leão, R., Apolónio, J. D., Lee, D., Figueiredo, A., Tabori, U., Castelo-Branco, P. 2018. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *J. Biomed. Sci.* 25: 22.

Lei, J. L., Xia, S. L., Wang, Y., Du, M., Xiang, G. T., Cong, X., Luo, Y., Li, L. F., Zhang, L., Yu, J., Hu, Y., Qiu, H. J., Sun, Y. 2016. Safety and immunogenicity of a gE/gI/TK gene-deleted pseudorabies virus variant expressing the E2 protein of classical swine fever virus in pigs. *Immunol. Lett.* 174: 63-71.

Leopardi, R., Roizman, B. 1996. The herpes simplex virus major regulatory protein ICP4 blocks apoptosis induced by the virus or by hyperthermia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 9583-9587.

Lerma, L., Alcalá, S., Piñero, C., Torres, M., Martín, B., Lim, F., Sainz, Jr. B., Tabarés, E. 2016a. Expression of the immediate early IE180 protein under the control of the hTERT and CEA tumor-specific promoters in recombinant pseudorabies viruses: effects of IE180 protein on promoter activity and apoptosis induction. *Virology* 488: 9-19.

Lerma, L., Muñoz, A. L., Wagner, S., Dinu, M., Martín, B., Tabarés, E. 2016b. Construction of recombinant pseudorabies viruses by using PRV BACs deficient in IE180 or *pac* sequences: application of vBAC90D recombinant virus to production of PRV amplicons. *Virus Res.* 213: 274-282.

Lin, J. J., Smith, M., Jessee, J., Bloom, F. 1992. DH11S: an Escherichia coli strain for preparation of single-stranded DNA from phagemid vectors. *Biotechniques* 12: 718-721.

List, T., Neri, D. 2013. Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy. *Clin. Pharmacol.* 5: 29-45.

Liu, N., Furukawa, T., Kobari, M., Tsao, M. S. 1998. Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma. *Am. J. Pathol.* 153: 263-269.

Maga, G., Verri, A., Bonizzi, L., Ponti, W., Poli, G., Garbesi, A., Niccolai, D., Spadari, S., Focher, F. 1993. Lack of stereospecificity of suid pseudorabies virus thymidine kinase. *Biochem. J.* 294: 381-385.

Marcaccini, A., Alemañ, N., Quiroga, M. I., López, M., Guerrero, F., Nieto, J. M. 2006. Temporary inhibition of neuronal apoptosis in Aujeszky's disease virus-infected swine. *Vet. Microbiol.* 113: 237-242.

Maroun, J., Muñoz-Alía, M., Ammayappan, A., Schulze, A., Peng, K. W., Russel, S. 2017. Designing and building oncolytic viruses. *Future Virol.* 12: 193-213.

Martuza, R. L., Malick, A., Markert, J. M., Ruffner, K. L., Coen, D. M. 1991. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252: 854-856.

Mavroudi, M., Zarogoulidis, P., Porpodis, K., Kioumis, I., Lampaki, S., Yarmus, L., Malecki, R., Zarogoulidis, K., Malecki, M. 2014. Stem cells' guided gene therapy of cancer: new frontier in personalized and targeted therapy. *J. Cancer Res. Ther.* 2: 22-33.

McFerran, J. B., Dow, C. 1975. Studies on immunization of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 19: 17-22.

Mettenleiter, T. C., Saalmüller, A., Weiland, F. 1993. Pseudorabies virus protein homologous to herpes simplex virus type 1 ICP18.5 is necessary for capsid maturation. *J. Virol.* 67: 1236-1245.

Mettenleiter, T. C. 2000. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis - state of the art, June 1999. *Vet. Res.* 31: 99-115.

Mettenleiter, T. C. 2002. Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.* 76: 1537-1547.

Miest, T., Cattaneo, R. 2014. New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 23-34.

Miranda-Lorenzo, I., Dorado, J., Lonardo, E., Alcala, S., Serrano, A. G., Clausell-Tormos, J., Cioffi, M., Megias, D., Zagorac, S., Balic, A., Hidalgo, M., Erkan, M., Kleeff, J., Scarpa, A., Sainz, B. Jr., Heeschen, C. 2014. Intracellular autofluorescence: a biomarker for epithelial cancer stem cells. *Nat. Methods* 11: 1161-1169.

Monsurrò, V., Beghelli, S., Wang, R., Barbi, S., Coin, S., Di Pasquale, G., Bersani, S., Castellucci, M., Sorio, C., Eleuteri, S., Worschech, A., Chiorini, J. A., Pederzoli, P., Alter, H., Marincola, F. M., Scarpa, A. 2010. Anti-viral state segregates two molecular phenotypes of pancreatic adenocarcinoma: potential relevance for adenoviral gene therapy. *J. Transl. Med.* 8: 10.

Mueller, M. T., Hermann, P. C., Witthauer, J., Rubio-Viqueira, B., Leicht, S. F., Huber, S., Ellwart, J. W., Mustafa, M., Bartenstein, P., D'Haese, J. G., Schoenberg, M. H., Berger, F., Jauch, K. W., Hidalgo, M., Heeschen, C. 2009. Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. *Gastroenterology* 137: 1102-1113.

Müller, T., Hahn, E. C., Tottewitz, F., Kramer, M., Klupp, B. G., Mettenleiter, T. C., Freuling, C. 2011. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective. *Arch. Virol.* 156: 1691-1705.

Muñoz, A. L., Prieto, C., Tabarés, E. 2006. A comparison of enhanced green fluorescent protein expression induced by immediate-early cytomegalovirus (IE-CMV) and gG pseudorabies virus (gG-PRV) promoters, using pseudorabies virus amplicons as vectors. *J. Virol. Methods* 136: 257-260.

Muñoz, A. L., Torres, M., Martín, B., Lerma, L., Tabarés, E. 2010. Regulation of pseudorabies virus gG glycoprotein gene promoter independently of pseudorabies immediate early IE180 protein. *Arch. Virol.* 155: 515-523.

Muñoz, A. L., Gadea, I., Lerma, L., Varela, L., Torres, M., Martín, B., García-Culebras, A., Lim, F., Tabarés, E. 2011. Construction and properties of a recombinant pseudorabies virus with tetracycline-regulated control of immediate-early gene expression. *J. Virol. Methods* 171: 253-259.

Nap, M., Mollgard, K., Burtin, P., Fleuren, G. J. 1988. Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumour Biol.* 9: 145-153.

Nauwynck, H., Glorieux, S., Favoreel, H., Pensaert, M. 2007. Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract. *Vet. Res.* 38: 229-241.

Nugent, C. I., Lundblad, V. 1998. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev.* 12: 1073-1085.

Oehmig, A., Fraefel, C., Breakefield, X. O. 2004. Update on herpesvirus amplicon vectors. *Mol. Ther.* 10: 630-643.

Osten, P., Grinevich, V., Cetin, A. 2007. Viral vectors: a wide range of choices and high levels of service. *Handb. Exp. Pharmacol.* 178: 177-202.

Oyibo, H. K., Znamenskiy, P., Oviedo, H. V., Enquist, L. W., Zador, A. M. 2014. Long-term Cre-mediated retrograde tagging of neurons using a novel recombinant pseudorabies virus. *Front. Neuroanat.* 8: 86.

Palumbo, S. L., Ebbinghaus, S. W., Hurley, L. H. 2009. Formation of a unique end-to-end stacked pair of G-quadruplexes in the hTERT core promoter with implications for inhibition of telomerase by G-quadruplex-interactive ligands. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 10878-10891.

Piñero, C. 2009. hTERT promoter regulation by immediate-early alphaherpesvirus proteins: contribution to PRV-based oncolytic vectors development. Biotechnology Master Thesis, Universidad Autónoma de Madrid.

Pol, J., Kroemer, G., Galluzzi, L. 2016. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology* 5: e1115641.

Poll, J., Bloy, N., Obrist, F., Eggermont, A., Galon, J., Cremer, I., Erbs, P., Limacher, J. M., Preville, X., Zitvogel, L., Kroemer, G., Galluzzi, L. 2014. Oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncoimmunology* 3: e28694.

Pomeranz, L. E., Reynolds, A. E., Hengartner, C. J. 2005. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 462-500.

Prieto, J., Solera, J., Tabarés, E. 2002. Development of new expression vector based on pseudorabies virus amplicons: application to human insulin expression. *Virus Res.* 89: 123-129.

Puzanov, I., Milhem, M. M., Minor, D., Hamid, O., Li, A., Chen, L., Chastain, M., Gorski, K. S., Anderson, A., Chou, J., Kaufman, H. L., Andtbacka, R. H. I. 2016. Talimogene laherparepvec in combination with ipilimumab in previously untreated, unresectable stage IIIB-IV melanoma. *J. Clin. Oncol.* 34: 2619-2626.

Rall, G. F., Kupersmidt, S., Sugg, N., Veach, R. A., Ben-Porat, T. 1992. Functions of the sequences at the ends of the inverted repeats of pseudorabies virus. *J. Virol.* 66: 1506-1519.

Rang, A., Will, H. 2000. The tetracycline-responsive promoter contains functional interferon-inducible response elements. *Nucleic Acids Res.* 28: 1120-1125.

Reed, L. J., Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.

- Rehman, H., Silk, A. W., Kane, M. P., Kaufman, H. L. 2016. Into the clinic: Talimogene laherparepvec (T-VEC), a first-in-class intratumoral oncolytic viral therapy. *J. Immunother. Cancer* 4: 53.
- Rizeq, B., Zakaria, Z., Ouhtit, A. 2017. Towards understanding the mechanisms of actions of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 in cancer progression. *Cancer Sci.* 109: 33-42.
- Roizman, B., Knipe, D. M., Whitley, R. J. 2007. The replication of Herpes simplex viruses. Fields' Virology 5<sup>th</sup> edition. Knipe, D. M., Howley, P., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., Straus, S. E., Editors. Lippincott-Williams and Wilkins, Philadelphia, P. A., pp 2501-2601.
- Roulston, A., Marcellus, R. C., Branton, P. E. 1999. Viruses and apoptosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 577-628.
- Ru, Q., Li, W., Wang, X., Zhang, S., Chen, L., Zhang, Y., Ge, Y., Zu, Y., Zheng, D. 2017. Preclinical study of rAAV2-sTRAIL: pharmaceutical efficacy, biodistribution and safety in animals. *Cancer Gene Ther.* 24: 251-258.
- Russell, S. J., Peng, K. W., Bell, J. C. 2012. Oncolytic virotherapy. *Nat. Biotechnol.* 30: 658-670.
- Sainz, B. Jr., LaMarca, H. L., Garry, R. F., Morris, C. A. 2005. Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alpha/beta and interferon-gamma. *Viol. J.* 2: 14.
- Sainz, B. Jr., Martín, B., Tatari, M., Heeschen, C., Guerra, S. 2014. ISG15 is a critical microenvironmental factor for pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 74: 7309-7320.
- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sæbøe-Larssen, S., Fossberg, E., Gaudernack, G. 2006. Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues. *BMC Mol. Biol.* 7: 26.

Sawitzky, D. 1997. Transmission, species specificity, and pathogenicity of Aujeszky's disease virus. *Arch. Virol. Suppl.* 13: 201-206.

Schrewe, H., Thompson, J., Bona, M., Hefta, L. J. F., Maruya, A., Hassauer, M., Shively, J. E., Von Kleist, S., Zimmermann, W. 1990. Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. *Mol. Cell Biol.* 10: 2738-2748.

Shen, Y., Nemunaitis, J. 2006. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther.* 13: 975-992.

Shiau, A. L., Lin, Y. P., Shieh, G. S., Su, C. H., Wu, W. L., Tsai, Y. S., Cheng, C. W., Lai, M. D., Wu, C. L. 2007. Development of a conditionally replicating pseudorabies virus for HER-2/neu-overexpressing bladder cancer therapy. *Mol. Ther.* 15: 131-138.

Smith, G. A., Enquist, L. W. 2000. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 4873-4878.

Spear, P. G., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H. 2000. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 275: 1-8.

Spear, P. G., Longnecker, R. 2003. Herpesvirus entry: and update. *J. Virol.* 77: 10179-10185.

Sze, D. Y., Reid, T. R., Rose, S. C. 2013. Oncolytic virotherapy. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 24: 1115-1122.



Tabarés, E. 1987. Detection of DNA viruses by radioactive and non radioactive DNA probes: application to African swine fever virus. *Arch. Virol.* 92: 233-242.

Taharaguchi, S., Kon, Y., Yoshino, S., Ono, E. 2003. Impaired development of the cerebellum in transgenic mice expressing the immediate-early protein IE180 of pseudorabies virus. *Virology* 307: 243-254.

Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Hirano, H., Takeda, J., Yutsudo, M., Inoue, M. 1999. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res.* 59: 551-557.

Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 231-241.

Taylor, T.J., Brockman, M. A., McNamee, E. E., Knipe, D. M. 2002. Herpes simplex virus. *Front. Biosci.* 7: 752-764.

Tomioka, Y., Miyazaki, T., Taharaguchi, S., Yoshino, S., Morimatsu, M., Uede, T., Ono, E., Watanabe, M. 2008. Cerebellar pathology in transgenic mice expressing the pseudorabies virus immediate-early protein IE180. *Eur. J. Neurosci.* 27: 2115-2132.

Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Giudice, L. C., Hoffman, A. R. 2001. Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development. *Int. J. Cancer* 91: 644-649.

Van Opdenbosch, N., Van den Broeke, C., De Regge, N., Tabarés, E., Favoreel, H. W. 2012. The IE180 protein of pseudorabies virus suppresses phosphorylation of translation initiation factor eIF2 $\alpha$ . *J. Virol.* 86: 7235-7240.

Verheije, M. H., Rottier, P. J. M. 2012. Retargeting of viruses to generate oncolytic agents. *Adv. Virol.* 2012: 798526.

Verma, I. M., Weitzman, M. D. 2005. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 711-738.

Viejo-Borbolla, A., Muñoz, A., Tabarés, E., Alcamí, A. 2010. Glycoprotein G from pseudorabies virus binds to chemokines with high affinity and inhibits their function. *J. Gen. Virol.* 91: 23-31.

Vlcek, C., Kozmík, Z., Paces, V., Schirm, S., Schwyzer, M. 1990. Pseudorabies virus immediate-early gene overlaps with an oppositely oriented open reading frame: characterization of their promoter and enhancer regions. *Virology* 179: 365-377.

Vlcek, C., Paces, V., Schwyzer, M. 1989. Nucleotide sequence of the pseudorabies virus immediate early gene, encoding a strong transactivator protein. *Virus Genes* 2: 335-346.

Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S. A., Ma, W. W., Saleh, M. N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R. K., Tabernero, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., Van Cutse, E., Wei, X., Iglesias, J., Renschler, M. F. 2013. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* 369: 1691-1703.

Watanabe, D. 2010. Medical application of herpes simplex virus. *J. Dermatol. Sci.* 57: 75-82.

Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., Bodnar, A. G., Lichtsteiner, S., Kim, N. W., Trager, J. B., Taylor, R. D., Carlos, R., Andrews, W. H., Wright, W. E., Shay, J. W., Harley, C. B., Morin, G. B. 1997. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat. Genet.* 17: 498-502.

Williams, A. F., Barclay, A. N. 1988. The immunoglobulin superfamily – domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6: 381-405.

Wollmann, G., Tattersall, P., Van den Pol, A. N. 2005. Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential. *J. Virol.* 79: 6005-6022.

Wong, M. L., Ho, T. Y., Huang, J. H., Hsiang, C. Y., Chang, T. J. 1997. Stimulation of type I DNA topoisomerase gene expression by pseudorabies virus. *Arch. Virol.* 142: 2099-2105.

Wuest, T., Zheng, M., Efstathiou, S., Halford, W. P., Carr, D. J. J. 2011. The herpes simplex virus-1 transactivator infected cell protein-4 drives VEGF-A dependent neovascularization. *PLoS Pathog.* 7: e1002278.

Zeyauallah, M., Patro, M., Ahmad, I., Ibraheem, K., Sultan, P., Nehal, M., Ali, A. 2012. Oncolytic viruses in the treatment of cancer: a review of current strategies. *Pathol. Oncol. Res.* 18: 771-781.

Zhang, C., Wang, Q. T., Liu, H., Zhang, Z. Z., Huang, W. L. 2011. Advancement and prospects of tumor gene therapy. *Chin. J. Cancer* 30: 182-188.

Zhou, X., Jiang, W., Liu, Z., Liu, S., Liang, X. 2017. Virus infection and death receptor-mediated apoptosis. *Viruses* 9: 316.

## Apéndice

---

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha dado lugar a:

### Comunicaciones en Congresos

- 1. L. Lerma, I. Gadea, L. Varela, A. L. Muñoz, B. Martín, E. Tabarés.**  
Título: Propiedades biológicas del virus de la pseudorrabia (PRV-BT90) cuya replicación es inducible con tetraciclina.  
Tipo de participación: Poster  
Congreso: XI Congreso Nacional de Virología  
Lugar de celebración: Granada. Fecha: Mayo 2011
- 2. L. Lerma, M. Torres, B. Martín, E. Tabarés.**  
Título: Efecto de la proteína IE180 del virus de la pseudorrabia sobre la actividad de los promotores tumorales humanos hTERT y CEA.  
Tipo de participación: Poster  
Congreso: XI Congreso Nacional de Virología  
Lugar de celebración: Granada. Fecha: Mayo 2011
- 3. L. Lerma, A. L. Muñoz, L. Varela, M. Dinu, I. Díez, B. Martín, I. Gadea, E. Tabarés.**  
Título: Construction and characterization of recombinant pseudorabies virus (PRV) by using BAC80 deficient in *pac* sequences.  
Tipo de participación: Poster  
Congreso: XII Congreso Nacional de Virología  
Lugar de celebración: Burgos. Fecha: Junio 2013
- 4. L. Lerma, C. Piñero, M. Torres, B. Martín, F. Lim, E. Tabarés.**  
Título: Effect of pseudorabies virus immediate early IE180 protein and herpes simplex virus type 1 ICP4 protein on the activity of the hTERT and CEA tumor specific promoters.  
Tipo de participación: Poster  
Congreso: 5<sup>th</sup> European Congress of Virology  
Publicación: Virologie vol 17, Supplement  
Lugar de celebración: Lyon, Francia. Fecha: Septiembre 2013

**5. L. Lerma, B. Martín, B. Sainz Jr., E. Tabarés.**

Título: Expression of pseudorabies virus IE180 protein under the control of human tumor-specific promoters (hTERT and CEA): I.- Application to obtain cytolytic vectors in tumor cells.

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: XIII Congreso Nacional de Virología

Lugar de celebración: Madrid. Fecha: Junio 2015

**6. L. Lerma, S. Alcalá, B. Martín, B. Sainz Jr., E. Tabarés.**

Título: Expression of pseudorabies virus IE180 protein under the control of human tumor-specific promoters (hTERT and CEA): II.- Effect of IE180 on apoptosis induction.

Tipo de participación: Poster

Congreso XIII Congreso Nacional de Virología

Lugar de celebración: Madrid. Fecha: Junio 2015

## **Publicaciones**

- 1.** A. L. Muñoz, M. Torres, B. Martín, **L. Lerma**, E. Tabarés. 2010. Regulation of pseudorabies virus gG glycoprotein gene promoter independently of pseudorabies immediate early IE180 protein. Arch Virol, 155: 515-523.
- 2.** A. L. Muñoz, I. Gadea, **L. Lerma**, L. Varela, M. Torres, A. García-Culebras, B. Martín, F. Lim, E. Tabarés. 2011. Construction and properties of pseudorabies virus recombinants with tetracycline-regulated control of immediate-early gene expression. J Virol Methods, 171: 253-259.
- 3.** **L. Lerma**, S. Alcalá, C. Piñero, M. Torres, B. Martín, F. Lim, B. Sainz Jr., E. Tabarés. 2015. Expression of the immediate early IE180 protein under the control of the hTERT and CEA tumor-specific promoters in recombinant pseudorabies viruses: Effects of IE180 protein on promoter activity and apoptosis induction. Virology, 488: 9-19.

4. **L. Lerma**, A. L. Muñoz, S. Wagner, M. Dinu, B. Martín, E. Tabarés. 2016. Construction of recombinant pseudorabies viruses by using PRV BACs deficient in IE180 or *pac* sequences: Application of vBAC90D recombinant virus to production of PRV amplicons. *Virus Res*, 213: 274-282.